



UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PADOVA

FACOLTA' DI SCIENZE MM.FF.NN.

Dipartimento di Scienze Chimiche

TESI DI LAUREA SPECIALISTICA IN CHIMICA

**ANALOGHI CONTENENTI LYS DEL PEPTIDE
ANTIBATTERICO TRICOGINA GA IV :
SINTESI E STUDI CONFORMAZIONALI.**

Relatore: Prof. Fernando Formaggio
Controrelatore: Prof.ssa Dolores Fregona

Laureando: Stefano Sudiro

ANNO ACCADEMICO: 2008-2009

Indice generale

Abbreviazioni.....	iii
Riassunto.....	v
I Introduzione.....	1
I.1 Antibiotici Peptaibolici.....	1
I.2 Stereochimica dei peptidi ricchi di Aib.....	2
I.3 Tricogina GA IV	6
I.4 Conformazione e meccanismo d'azione sulle membrane	6
I.5 Scopo della tesi	10
II Parte Sperimentale.....	13
II.1 Materiali e metodi.....	13
II.1.1 Reagenti e solventi.....	13
II.1.2 Strumenti e metodi.....	14
II.2 Sintesi e Caratterizzazione:.....	19
II.2.1 Sintesi dei derivati.....	19
II.2.2 Sintesi del segmento A.....	22
II.2.3 Sintesi del segmento B.....	23
II.2.4 Sintesi del segmento C.....	25
II.2.5 Sintesi del segmento D.....	26
II.2.6 Sintesi del segmento E.....	27
II.2.7 Condensazione dei segmenti A e B.....	29
II.2.8 Condensazione dei segmenti E e B.....	30
II.2.9 Sintesi dell'analogo con Lys in posizione 2.....	31
II.2.10 Sintesi dell'analogo con Lys in posizione 9.....	33
III Risultati e discussione:.....	37
III.1 Strategia di sintesi dei peptidi.....	37
III.1.1 Gruppi protettori.....	39
III.1.2 Metodi di attivazione.....	40
III.1.3 Metodiche di caratterizzazione.....	42
III.2 Indagini conformazionali.....	42
III.2.1 Assorbimento IR.....	42
III.2.2 Spettroscopia ¹ H-NMR degli analoghi contenenti Lys(Z).....	48
III.2.3 Dicroismo Circolare.....	51

III.3	Interazioni con membrane fosfolipidiche.....	55
III.3.1	Modulazione della permeabilità di membrane lipidiche artificiali.....	55
IV	Conclusioni:.....	60
V	Bibliografia.....	61

Abbreviazioni

Ac	= acetile
AcOEt	= acetato di etile
Aib	= acido α -amminoisobutirrico
Bzl	= benzile
CD	= dicroismo circolare
Ch	= colesterolo
CF	= carbossifluoresceina
DCM	= diclorometano
DEA	= dietilammina
DMF	= dimetilformammide
DMSO	= dimetilsolfossido
EDC	= N-etil-N'-(3-dimetilammino)propil-carbodiimmide
EP	= etere di petrolio
PC	= fosfatidilcolina
Fmoc	= 9-fluorenilmetossicarbonile
Gly	= glicina
Hepes	= acido 2-[4-(2-idrossietil)-1-piperazino]etansolfonico
HOAt	= 1-idrossi-7-aza-1,2,3-benzotriazolo
HOBt	= 1-idrossi-1,2,3-benzotriazolo
HPLC	= cromatografia liquida ad alte prestazioni
Leu	= leucina
Lol	= leucinolo
NMM	= N-metilmorfolina
NMR	= risonanza magnetica nucleare
NOESY	= spettroscopia di correlazione dipolare
Oct	= n-ottanoile
OMe	= metossi
OSu	= 1-ossi-succinimmide
OtBu	=terz-butilossi
R _f	= fattore di ritenzione
ROESY	= spettroscopia di correlazione dipolare nel sistema di riferimento rotante
SUV	= vescicole unilamellari piccole
SDS	= sodio dodecil idrogeno solfato
SUV	= small unilamellar vesicles
TDM	= N,N,N',N'-tetrametil-4,4'-diammino difenil metano
TEA	= trietilammina
TFA	= acido trifluoroacetico
THF	= tetraidrofurano
TLC	= cromatografia su strato sottile
TOCSY	= spettroscopia di correlazione scalare omonucleare tipo Hartmann-Hahn
TOF	= analizzatore a tempo di volo (time of flight)
Triton X-100	= polietilenglicole terzocetilfeniletere
Z	=benzilossicarbonile

N.B: Nel testo gli amminoacidi chirali si intendono di configurazione L qualora questa non venga specificata.

Riassunto

In questa Tesi si riportano la sintesi e gli studi conformazionali di due analoghi della tricogina GA IV (*n*-Oct-Aib-Gly-Leu-Aib-Gly-Gly-Leu-Aib-Gly-Ile-Lol), un peptide naturale ad attività antimicrobica. Inoltre, si riporta l'attività di permeabilizzazione di doppi strati fosfolipidici da parte dei due peptidi sintetizzati, le cui sequenze sono:

n-Oct-Aib-**Lys**-Leu-Aib-Gly-Gly-Leu-Aib-Gly-Ile-Leu-OMe (*n*-Oct = *n*-ottanoile)

n-Oct-Aib-Gly-Leu-Aib-Gly-Gly-Leu-Aib-**Lys**-Ile-Leu-OMe

Essi sono caratterizzati dall'inserimento di un residuo di Lys, in posizione 2 o 9, al posto di uno di Gly. La scelta di inserire residui di Lys deriva dall'osservazione che molti peptidi antibatterici possiedono residui cationici. Inoltre, tale sostituzione aumenta notevolmente la solubilità in acqua della tricogina. L'unità C-terminale Leu-OMe, al posto del leucinolo della tricogina naturale, è una modifica che abitualmente non altera l'attività antimicrobica.

Le indagini conformazionali in soluzione, condotte mediante assorbimento IR, spettrometria NMR e dicrosma circolare, hanno indicato che i due analoghi della tricogina sintetizzati assumono conformazioni elicoidali, probabilmente di tipo misto $\alpha/3_{10}$. I due peptidi sono anche in grado di permeabilizzare membrane modello, formate da fosfatidilcolina e colesterolo, con potenza paragonabile a quella della tricogina.

Sono attualmente in corso i test antimicrobici presso i laboratori del prof. Kyung-Soo Hahm (Chousun University, Gwangju, Corea).

I Introduzione

I.1 Antibiotici Peptaibolici

Dall'introduzione degli antibiotici β -lattamici nel 1942, causa l'uso intensivo e su vasta scala, i batteri hanno cominciato a sviluppare resistenza ai farmaci utilizzati. Questo ha portato alla continua modificazione della catena laterale del nucleo *penam*, rincorrendo sempre nuova efficacia. Si è anche intrapresa la strada di provare molecole diverse, che abbiano pur sempre caratteristiche antibatteriche ma che siano completamente diverse dai classici β -lattamici, e possibilmente tali che i batteri più difficilmente riescano a sviluppare resistenza.

Sono stati isolati da microbi e funghi miscele di peptidi *ionoforici* [1], il cui meccanismo di azione consiste nel modificare la permeabilità agli ioni delle membrane biologiche, causando quindi la morte della cellula (alcuni indicati in Illustrazione 1). Tale permeabilità può essere dovuta al trasporto diretto (*ionofori carrier*) o alla creazione di canali ionici (*ionofori channel former*). Al primo tipo appartengono peptidi ciclici capaci di chelare selettivamente ioni metallici, formando complessi lipofili capaci di diffondere attraverso le membrane, mentre gli *ionofori channel former* sono generalmente costituiti da peptidi lineari capaci di autoassemblarsi nella membrana formando dei pori, adatti alla diffusione di ioni.

Gli antibiotici *peptaibolici* [2,3] sono dei peptidi che appartengono alla classe dei *channel former*. Il nome di questi composti deriva dalla loro caratteristica di essere costituiti da una catena lineare di natura peptidica, ricca in acido α -ammino-iso-butirrico (*Aib*) e con l'estremità C-terminale legata ad un alcool (*1,2 ammino alcool*).

ALCUNI ANTIBIOTICI PEPTAIBOLICI RAPPRESENTATIVI	
ALAMETICINA	Ac Aib Pro Aib Ala Aib Ala Gln Aib Val Aib Gly Leu Aib Pro Val Aib Aib Glu Gln Fol
TRICORZIANINA	Ac Aib Ala Ala Aib Aib Gln Aib Aib Aib Ser Leu Aib Pro Leu Aib Ile Gln Gln Wol
TRICOTOXINA	Ac Aib Gly Aib Leu Aib Gln Aib Aib Ala Ala Aib Aib Pro Leu Aib Iva Glu Vol
ZERVAMICINA	Ac Trp Ile Glu Iva Val Thr Aib Leu Aib Hyp Gln Aib Hyp Aib Pro Fol
SAMAROSPORINA	Ac Phe Aib Aib Aib Val Gly Leu Aib Aib Hyp Gln Iva Hyp Ala Fol
TRICOVIRINA	Ac Aib Asn Leu Aib Pro Ser Val Aib Pro Aib Leu Aib Pro Lol
CERVININA	Ac Leu Aib Pro Aib Leu Aib Pro Ala Aib Pro Val Lol
ARZIANINA	Ac Aib Asn Leu Ile Aib Pro Iva Leu Aib Pro Lol
TRICOGINA	FA Aib Gly Leu Aib Gly Gly Leu Aib Gly Ile Lol
TRICONINGINA KB I	FA Aib Gly Val Aib Gly Gly Val Aib Gly Ile Lol
TRICONINGINA KB II	FA Iva Gly Val Aib Gly Gly Val Aib Gly Ile Lol
LP237-F8	FA Aib Pro Phe Aib Gln Gln Aib Etn Gln Ala Lol
TRICODECENINA	FA Gly Gly Leu Aib Gly Ile Lol
PEPTAIBOLINA	Ac Leu Aib Leu Aib Fol

(FA, *fatty acid*, indica un acido grasso con un numero di atomi di carbonio compreso tra 8 e 15).

Illustrazione 1: Sequenze amminoacidiche di una selezione rappresentativa di antibiotici peptaibolici.

Alcuni peptaibolici hanno tra i loro residui varianti di amminoacidi C^α -tetrasostituiti, come l'*isovalina* e la α -etilnorvalina (Illustrazione 2). Una caratteristica di queste molecole è la presenza di una catena acilica più o meno lunga che blocca l'estremità *N*-terminale. Per quelle contenenti una catena lunga (C_8), per esempio la *Tricogina GA IV* [4,5], le *triconingine KB I e II* [6], *tricodecenine I e II* [7] e altri antibiotici, è stato proposto il nome di *lipopeptaibolici* [8,5].

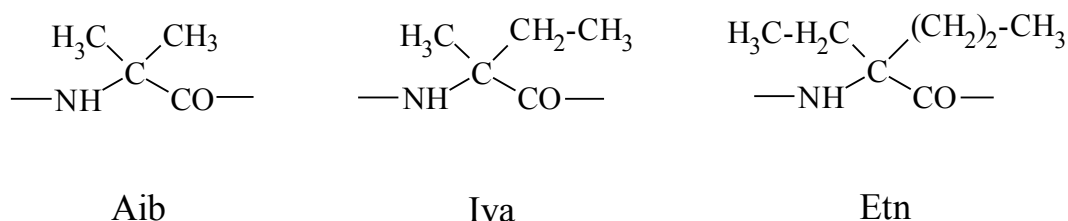


Illustrazione 2: Amminoacidi C^α -tetrasostituiti presenti nelle sequenze degli antibiotici peptaibolici

In natura queste molecole sono presenti come miscele di molecole spesso con differenze puntuali, di un solo amminoacido. Si suppone che questa distribuzione sia dovuta al fatto che non vengono prodotti mediante sintesi ribosomiale [9]. La separazione delle miscele viene eseguita con tecnica *HPLC*, mentre le strutture peptidiche vengono determinate grazie a studi di spettrometria di massa, ^1H e ^{13}C *NMR* [10,11]. Alcuni lavori, inoltre, mirano a comprendere la relazione tra sequenza e conformazione, in modo da associare ad una determinata struttura l'attività biologica. Data l'importanza dell'amminoacido *Aib* nell'indurre strutture elicoidali, molti studi mirano a individuare la dipendenza dell'attività dei *peptaibolici* dalla presenza di numerosi residui di *Aib*. Per tale ragione, la presente Introduzione riporta alcuni elementi di stereochimica di peptidi ricchi di *Aib*, prima di fare il punto su quanto finora nota sulla *tricogina GA IV*, oggetto di questa Tesi.

1.2 Stereochimica dei peptidi ricchi di Aib

L'*Aib* è il più semplice tra gli amminoacidi C^α -tetrasostituiti. Attraverso calcoli di energia conformazionale è stato evidenziato [12-14] che la presenza dei due gruppi metilici sul C^α impone una notevole restrizione allo spazio conformazionale accessibile all'*Aib*, il quale può quindi partecipare solo a strutture elicoidali di tipo α e 3_{10}

(Illustrazione 3). Essendo un amminoacido achirale le eliche destro e sinistrogire dei suoi omopeptidi sono isoenergetiche e quindi equiprobabili. Nel caso siano presenti altri amminoacidi chirali nella struttura, il senso di spiralizzazione dell'elica sarà governato dalla chiralità di tali amminoacidi: gli *L*-amminoacidi favoriscono eliche destrogire e viceversa.

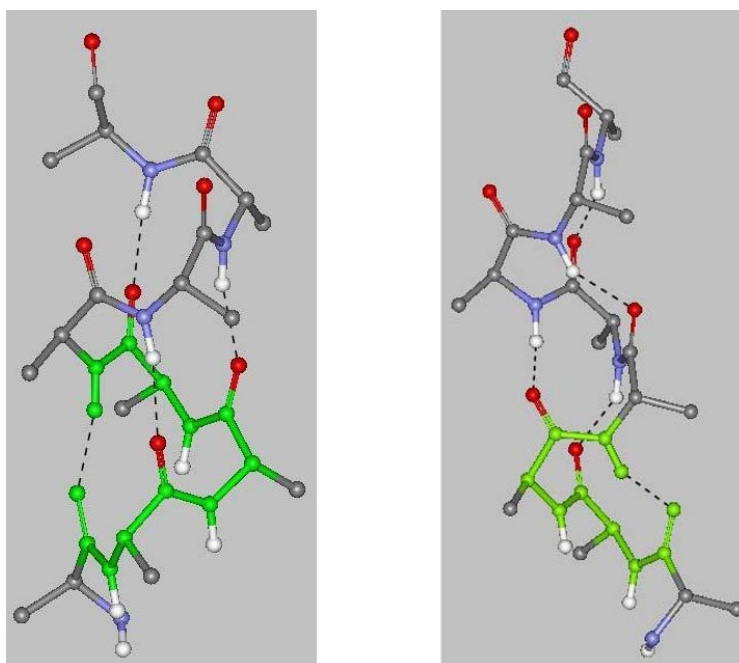


Illustrazione 3: Elica- α destrogira (a sx) ed elica- 3_{10} destrogira (a dx)

Nell' α -elica vi sono 3.63 residui per giro (Tabella 1) ed è stabilizzata da legami a idrogeno intramolecolare tra l'ossigeno carbonilico di un residuo ed il protone ammidico del quarto residuo successivo ($i \leftarrow i+4$) (Illustrazione 4), che chiudono un ciclo formato da 13 atomi (struttura C_{13} o *ripiegamento- α*). L' elica 3_{10} , invece, presenta 3.24 residui per giro con legami idrogeno intramolecolari tra l'ossigeno carbonilico di un residuo e il protone ammidico del terzo residuo successivo ($i \leftarrow i+3$). Il legame a idrogeno chiude quindi un ciclo di 10 atomi (struttura C_{10} o *ripiegamento- β*)

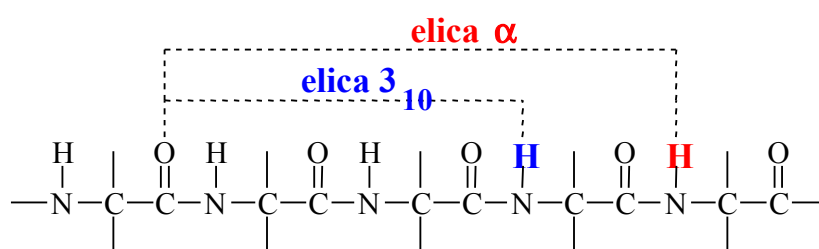


Illustrazione 4: Legame a idrogeno intramolecolare nei due tipi di elica (α e 3_{10})

Parametri	Elica 3_{10}	Elica α
ϕ	-57°	-63°
ψ	-30°	-42°
Angolo del legame idrogeno $N\cdots O=C$	128°	156°
Rotazione per residuo	111°	99°
Traslazione assiale per residuo	$1.94 \text{ \AA}$	$1.56 \text{ \AA}$
Numero di residui per giro	3.24	3.63
Passo dell'elica	$6.29 \text{ \AA}$	$5.67 \text{ \AA}$

Tabella 1: Parametri [15] per le eliche destrorse di tipo 3_{10} e α .

Per gli angoli torsionali che definiscono la conformazione di una catena polipeptidica (Illustrazione 5) viene utilizzata la convenzione raccomandata dalla Commissione IUPAC-IUB per la Nomenclatura Biochimica [16].

I ripiegamenti β [17-19] (β -turns; Illustrazione 6) sono stati classificati da Venkatachalam [17] nei tipi I, II, III (ripiegamenti destrorsi) e nei corrispondenti enantiomeri I' , II' , III' , a seconda dei valori degli angoli torsionali assunti dai residui $i+1$ e $i+2$ compresi entro il legame a idrogeno (Tabella 2). La successione di ripiegamenti- β di tipo III o III' genera *eliche- 3_{10}* destrorse o sinistrorse, rispettivamente.

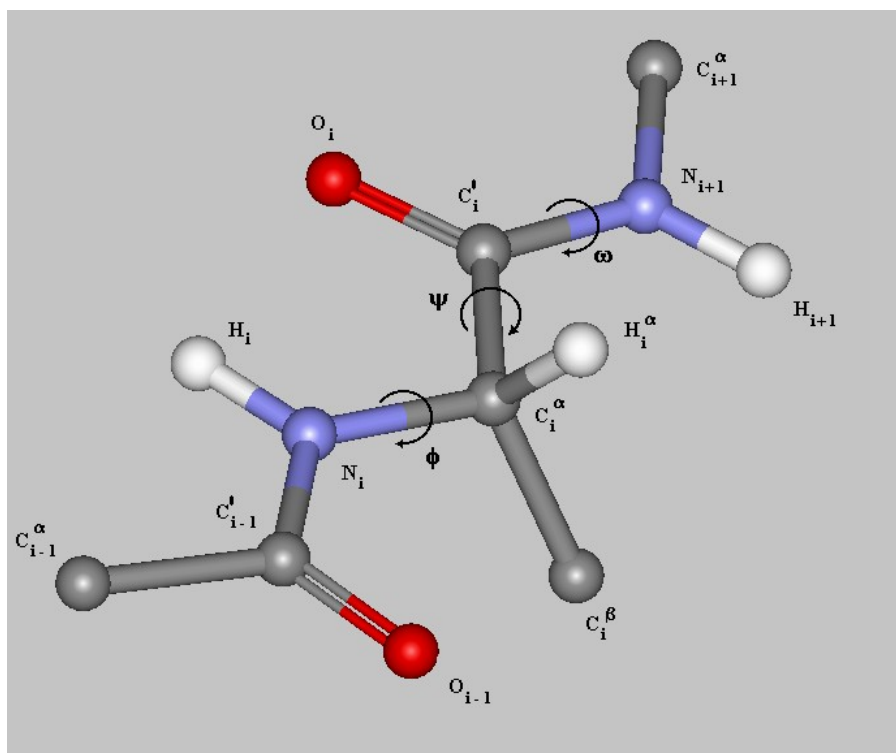


Illustrazione 5: Rappresentazione di una catena polipeptidica (due unità peptidiche) nella conformazione completamente estesa ($\Phi_i = \Psi_i = \omega_i = 180^\circ$). Sono indicate le notazioni raccomandate per gli atomi e gli angoli torsionali [28].

I peptidi contenenti *Aib* formano facilmente cristalli singoli, e ciò ha consentito lo studio [20-31] mediante diffrazione di raggi X: gli omo-tripeptidi *N*-protetti formano una struttura C_{10} di tipo *III* (o *III'*), indipendentemente dai gruppi terminali. I membri superiori della serie (fino all'undecamero) formano invariabilmente il numero massimo di strutture C_{10} consecutive di tipo *III* o (*III'*) compatibile con la lunghezza di catena, generando eliche 3_{10} .

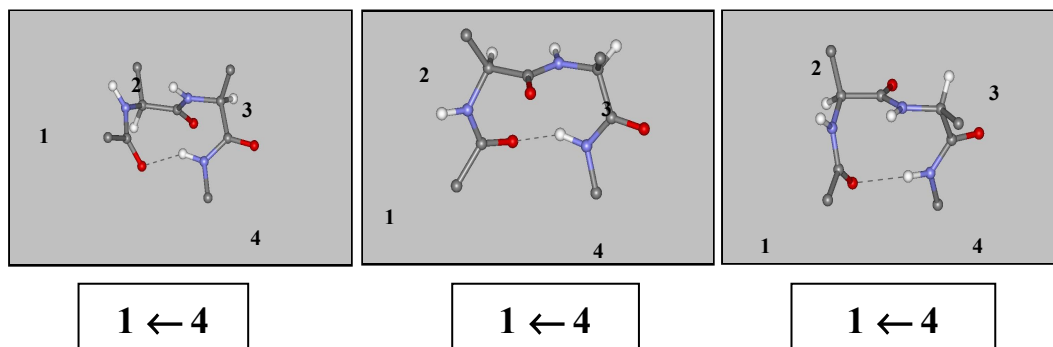


Illustrazione 6: Rappresentazione dei tre ripiegamenti- β ideali (I, II, III) aventi il legame peptidico centrale *trans*.

Ripiegamento- β	$\Phi (i+1)$	$\psi (i+1)$	$\Phi (i+2)$	$\psi (i+2)$
Tipo I	-60°	-30°	-90°	0°
Tipo II	-60°	$+120^\circ$	$+80^\circ$	0°
Tipo III	-60°	-30°	-60°	-30°

Tabella 2: Valori degli angoli Φ e ψ per i residui $i+1$ e $i+2$ nei ripiegamenti- β di tipo I, II e III.

La conformazione adottata allo stato cristallino dagli omopeptidi dell'*Aib* è quindi elicoidale di tipo 3_{10} . Indagini conformazionali in soluzione (mediante assorbimento *IR* e spettrometria 1H -NMR) indicano che tale conformazione prevale nettamente anche in solventi poco polari quale il deuterocloroformio [20,32]. Nel caso di peptidi contenenti residui di *Aib* e residui di amminoacidi proteici (C^α -trisostituiti), allo stato cristallino si riscontrano esclusivamente strutture elicoidali. Tali eliche possono essere di tipo 3_{10} , di tipo α , o “miste” (un segmento α -elicoidale preceduto e/o seguito da alcune strutture C_{10}). Dall’esame di oltre 40 strutture ai raggi X, riportate in letteratura fino al 1990, di peptidi di lunghezza compresa tra 4 e 16 residui contenenti *Aib* e amminoacidi proteici emerge che tra i fattori che concorrono ad orientare la preferenza conformazionale verso l’una o l’altra struttura elicoidale vi sono la lunghezza di catena, il contenuto in *Aib* e la sequenza [33,34]. Complessivamente l’ α -elica tende ad essere favorita al crescere della lunghezza di catena e al decrescere del contenuto in *Aib*, anche se le eccezioni sono

numerose e il ruolo giocato dalla sequenza è di problematica valutazione. D'altro canto i peptidi "corti" (fino a sei residui) manifestano una nettissima preferenza per l'*elica-3₁₀*.

In conclusione, la notevole mole di dati strutturali su peptidi contenenti *Aib* ha evidenziato l'elevata capacità di tale residuo amminoacidico non proteico di promuovere e stabilizzare i ripiegamenti- β e le conformazioni elicoidali.

I.3 Tricogina GA IV

n-Oct-Aib-Gly-Leu-Aib-Gly-Gly-Leu-Aib-Gly-Ile-Lol

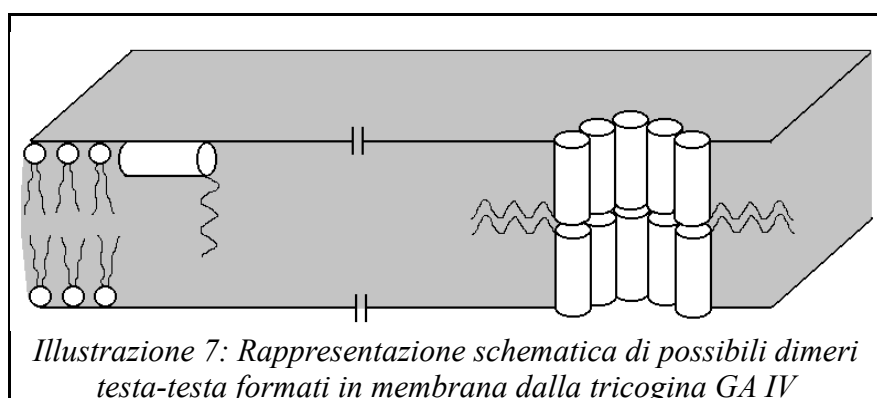
Come già accennato, la *Tricogina GA IV* fa parte della famiglia dei *lipopeptaibolici*, ossia presenta in posizione *N*-terminale un gruppo acilico di otto atomi di carbonio. Inoltre è più corta rispetto agli altri peptaibolici, è costituita da soli 11 residui contro per esempio i 18 dell'*alametina*: pertanto la lunghezza della catena, che in soluzione si trova avvolta ad elica, è sufficiente appena ad arrivare a metà del doppio strato fosfolipidico delle membrane. Inoltre generalmente i peptaibolici sono costituiti da amminoacidi idrofobici e idrofilici posti su facce opposte della struttura. La *Tricogina GA IV* invece non presenta residui idrofilici, anche se sono presenti quattro *Gly* su una faccia dell'elica che impongono comunque una certa anfifilicità. Questa particolare struttura permette, attraverso l'aggregazione di più unità peptidiche, di creare canali nelle membrane e aumentare la permeabilità agli ioni, anche in assenza di potenziale applicato. Infatti altri peptaibolici sono biologicamente attivi, ma regolati dalla presenza di potenziale (*voltage-gated*). E' documentato [4,6] che i lipopeptaibolici possiedono significativa attività antibiotica contro i batteri *Gram*⁺.

I.4 Conformazione e meccanismo d'azione sulle membrane

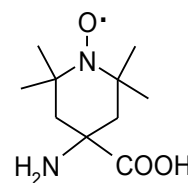
La *Tricogina GA IV* è stata la prima ad essere isolata, e quindi anche la più estesamente studiata. La sua conformazione in soluzione è stata studiata attraverso misure di *CD*, ^1H e ^{13}C -NMR in *MeO* [4b]: la conformazione proposta in base a tali studi è la α -elica (anche se irregolare) mista a struttura C_{10} nella regione *N*-terminale. Da studi di cristallografia [35] su cristalli di racemato si vede che il gruppo ottanoilico *N*-terminale è orientato perpendicolarmente all'asse dell'elica e la lunghezza della porzione peptidica è di circa 16 Å: questa corrisponde a circa metà dello spessore di una

membrana fosfolipidica a doppio strato.

Come già accennato, l'elica ha carattere *anfifilico*, presentando da una faccia i residui meno idrofobici, ossia le quattro glicine, e sull'altra faccia presenta i residui idrofobici. Dall'impaccamento cristallino si nota che le eliche si dispongono a cerchio in modo da formare un canale al cui interno sono affacciati gli amminoacidi meno idrofobici. Nel canale cocristallizzano molecole di acqua ed il canale si estende all'infinito per connessioni a legame idrogeno *testa-coda* tra molecole successive.



Quindi, visto che la *Tricogina GA IV* è troppo corta per bucare da sola l'intero spessore della membrana, si ipotizza che il modello di azione preveda che molecole di peptide si leghino *testa-testa* originando dimeri (Illustrazione 7), la cui lunghezza sarebbe sufficiente ad attraversare la membrana (modello a *doghe di botte*, Illustrazione 9). Dall'aggregazione di più dimeri si formerebbe così un canale idrofilico, al cui interno si trovano le facce ricche di *Gly*. La funzione del gruppo n-ottanoilico potrebbe essere quella di inserirsi tra le facce idrofobiche delle molecole orientate testa-testa, governando in qualche misura l'allineamento tra le due metà del poro.



Per meglio comprendere questi meccanismi sono stati effettuati studi [37] su analoghi della *Tricogina GA IV* con sostituzioni di residui di *Aib* con *TOAC*, che è un amminoacido C^α -tetrasostituito che presenta in catena laterale un radicale libero nitrossilico che può essere utilizzato come sonda *ESR* e *quencher* di fluorescenza. Le proprietà conformazionali di tale amminoacido sono simili a quelle del *Aib* (induce

ripiegamenti β e strutture elicoidali α e 3_{10} sia allo stato solido che in soluzione) [34,38-44]. Pertanto, tali sostituzioni non alterano la conformazione del peptide.

Dagli studi *ESR* in presenza di liposomi si vede che la *Tricogina GA IV* si dispone con l'asse dell'elica parallelo alla superficie della membrana lipidica [37]. Risultato confermato da misure di *quenching* di fluorescenza con membrane lipidiche a doppio strato contenenti sonde fluoroforiche a diverse profondità [45]. Questi risultati non concordano con il meccanismo a *doghe di botte*, ma questi studi, non essendo stati ottenuti in presenza di potenziale transmembrana, non sono necessariamente estendibili al caso dell'interazione della *Tricogina GA IV* con una membrana cellulare.

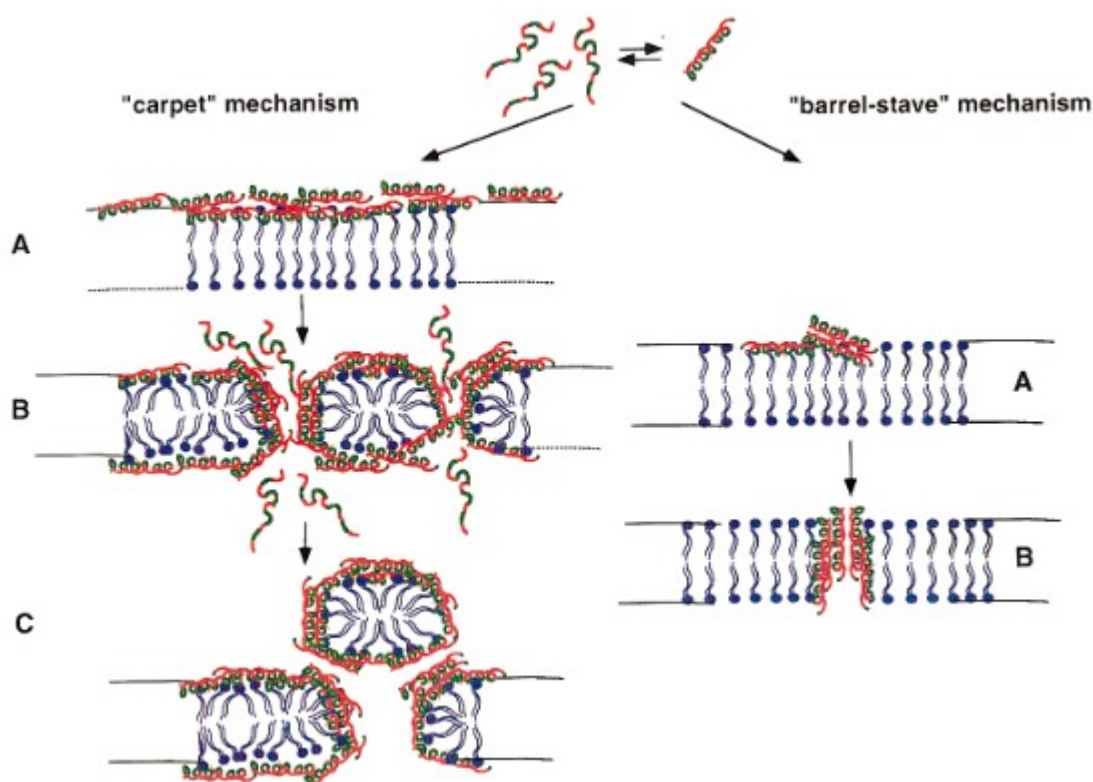
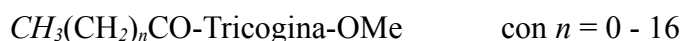


Illustrazione 9: Rappresentazione schematica dei meccanismi dei meccanismi più noti di permeazione delle membrane biologiche da parte di peptidi [36]. A sinistra modello “a tappeto”, a destra a “doghe di botte”. Nel modello a tappeto i peptidi posizionano la loro faccia idrofobica (in verde) all'interno della membrana e rivolgono quella idrofilica (in rosso) al solvente (stadio A). Quando viene raggiunta una concentrazione peptidica sufficiente, la membrana si frammenta (stadi B e C) e si forma un poro.

Successivi studi su analoghi contenenti opportune sonde fluorofore, attraverso misure di assorbimento *UV* e fluorescenza [46], condotte in presenza di liposomi, inducono a pensare che vi sia presenza contemporanea di una specie inattiva monomerica orientata parallelamente alla superficie del doppio strato e di una forma

aggregata, che si inserisce in membrana, consentendo il rilascio di marcatori inclusi nei liposomi (*leakage*). Inoltre, solo il rilascio di sonde di determinate dimensioni ($r \approx 2\text{nm}$) è risultato favorito, supportando l'ipotesi della formazione di un poro transmembrana.

Riguardo la funzione della catena acilica in posizione *N*-terminale, sono state sintetizzati [47] analoghi della *Tricogina GA IV* con catena laterale di lunghezza variabile:



e il *succinoyl-dimero*:



Il dimero mima la posizione *testa-testa* e ha lunghezza compatibile con il doppio strato della membrana. Le molecole sintetizzate presentano il metilestere su *C*-terminale, precursore sintetico dell'amminoalcol, in quanto è stato verificato che l'attività antibiotica non subisce variazioni. Studi *FT-IR*, *NMR* e *CD* hanno confermato una sostanziale identità conformazionale tra gli analoghi [47,48]. La capacità di modificare la permeabilità delle membrane lipidiche da parte della *Tricogina GA IV* e dei suoi analoghi è stata esaminata misurando la percentuale di rilascio di *carbossifluoresceina* (*CF*) da vescicole unilamellari (*SUV*) di *fosfatidilcolina/colesterolo* (*ePC/Ch*) 7:3, per rapporti $[\text{peptide}]/[\text{lipide}]$ variabili [47].

Al crescere della lunghezza della catena lipidica si è osservato un continuo aumento di attività (da C_3 a C_{10} ; C_2 è sostanzialmente inattivo) quindi una leggera diminuzione andando da C_{10} a C_{14} . Gli analoghi C_{16} e C_{18} sono praticamente inattivi. L'ultimo dato è probabilmente imputabile ad un effetto cinetico dovuto alla minor solubilità in acqua di questi analoghi se paragonati a quelli recanti catene aciliche più corte, e di conseguenza alla loro diffusione più lenta. Il *succinoyl dimero* è più efficiente di tutti gli undecapeptidi.

Misure di antibattericità su *Staphylococcus aureus* ed emoliticità su eritrociti umani indica che l'ordine di attività per gli analoghi C_2 , C_8 e C_{16} è compatibile con quello riscontrato dalle misure sui liposomi, ovvero l'analogo C_8 e il peptide naturale hanno proprietà identiche e gli analoghi C_2 e C_{16} sono praticamente inattivi.

E' stato anche sintetizzato un analogo in cui tutti i residui di Gly sono sostituiti da residui di Ser. Ne è stata risolta la struttura allo stato cristallino mediante diffrazione dei raggi X [49] e in ambiente micellare membrano-mimetico con esperimenti NMR bidimensionali. La conformazione è risultata sostanzialmente identica a quella della *Tricogina GA IV*. La presenza dei residui di Ser su una faccia della superficie elicoidale conferisce maggiore anfifilicità, e questo induce una maggiore attività emolitica e di alterazione della permeabilità delle membrane lipidiche [36,50].

1.5 Scopo della tesi

La capacità dei peptaibolici di perturbare i doppi strati fosfolipidici ha suscitato molto interesse per questi peptidi naturali ed i loro eventuali analoghi sintetici. Essi possono essere importanti sia per lo sviluppo di nuovi antibiotici che per approfondire la nostra comprensione sulle interazioni peptidi/membrane. Inoltre, il loro studio può aiutarci nella progettazione di sistemi supramolecolari, capaci di interagire con le membrane artificiali (liposomi, strati autoassemblati) e con quelle naturali (cellule, batteri). Poiché molti peptidi antibatterici possiedono residui cationici (ad es. Lys), che probabilmente interagiscono con gli anioni fosfato della superficie delle membrane, si è pensato di sintetizzare analoghi della tricogina aventi residui di Lys. Essi sono stati inseriti al posto di residui di Gly, in modo da non alterare l'anfifilicità dei peptidi. In particolare, nella presente Tesi sono riportate la sintesi e la caratterizzazione conformazionale di due analoghi della tricogina:

n-Oct-Aib-Lys(HCl)-Leu-Aib-Gly-Gly-Leu-Aib-Gly-Ile-OMe
n-Oct-Aib-Gly-Leu-Aib-Gly-Gly-Leu-Aib-Lys(HCl)-Ile-OMe

Ci si aspetta che l'attività antibatterica ne risulti potenziata. Inoltre, la solubilità in acqua impartita dalla Lys (la tricogina GA IV è molto poco idrosolubile) dovrebbe rendere i due analoghi più facilmente disponibili e veicolabili in un organismo vivente. Infine, è interessante ricordare che un semplice tetrapeptide contenente due Lys e un gruppo palmitoile (C₁₆) all'estremità N-terminale ha mostrato possedere attività antifungina [51]. Quest'ultima scoperta fa ben sperare in quanto anche la tricogina possiede all'estremità N-terminale un gruppo alchilico di discreta lunghezza (C₈).

Il lavoro presentato si articola in tre fasi:

- progettazione, messa a punto delle strategie di sintesi in soluzione e preparazione dei due analoghi della tricogina;
- purificazione e caratterizzazione conformazionale dei peptidi sintetizzati mediante tecniche spettroscopiche (assorbimento *IR*, *NMR*, *CD*);
- studio della capacità di tali analoghi della tricogina di formare canali attraverso membrane.

Le indagini conformazionali servono a controllare che le modifiche apportate non siano tali da compromettere la struttura nativa della tricogina, essendo questa strettamente correlata all'interazione con le membrane e, pertanto, all'attività antibiotica.

II Parte Sperimentale

II.1 Materiali e metodi

II.1.1 Reagenti e solventi

Acros-Janssen (Geel, Belgio): acetonitrile per spettroscopia, acido α -aminoisobutirrico, N-(benzilossicarbonilossi)-succinimide, 1-idrossi-1,2,3-benzotriazolo, cloroformio deuterato, dimetilsolfossido deuterato, metanolo per spettroscopia, N-etil-N'-(3-dimetilammino)propil-carbodiimide cloridrato, 2,2,2-trifluoroetanolo per spettroscopia, anidride acetica, THF, N-N-diisopropiletilamina, acido n-ottanoico, 1-idrossi-7-aza-1,2,3-benzotriazolo, TDM, SDS, Leucina, cloruro di tionile, acido solforico.

Alltech (Deerfield, USA): acetil cloruro, isopropanolo.

Aldrich Chem. Co. (Winsconsin, USA): iodio, N-metilmorfolina, Hepes, metanolo deuterato.

Alphagaz (Liscate, Milano): *iso*-butene.

Bachem (Bubendorf, Svizzera): Z-Glu(OMe)-OH, Fmoc-Osu.

Carlo Erba (Milano): acetato di etile, acetone, acido acetico glaciale, bicarbonato di sodio, bisolfato di potassio, 1-butanolo, cloroformio, cloruro di metilene, etanolo, etere dietilico, etere di petrolio (30-50 °C), idrossido di sodio, ipoclorito di sodio, metanolo, solfato di sodio anidro, toluene, bromuro di potassio.

Fluka (Buchs, Svizzera): acetonitrile, catalizzatore 10% Pd(C), N,N,N',N'-tetrametil-4,4'-diammino difenil metano, Triton X-100, dietilamina, CF.

Merck (Darmstadt, Germania): gel di silice per cromatografia "flash", SICAPENT con indicatore.

Perseptive Biosystems (Warrington, UK): 1-idrossi-7-aza-1,2,3-benzotriazolo.

Prolabo (Parigi, Francia): cloruro di sodio.

Sigma (St. Louis, USA): resina Sephadex G-75, colesterolo, α -fosfatidil-L-colina da uovo (tipo XVI-E, from fresh egg yolk P-3556, polvere liofilizzata).

II.1.2 Strumenti e metodi

Cromatografia su strato sottile - TLC

Le reazioni sono state seguite tramite cromatografia su strato sottile utilizzando lastre di gel di silice 60 F₂₅₄ (Merck). I fattori di ritenzione sono stati determinati utilizzando quattro diverse miscele di solventi come eluenti:

CHCl ₃ /EtOH 9:1	Rf ₁
1-butanolo/AcOH/H ₂ O 3:1:1	Rf ₂
toluene/EtOH 7:1	Rf ₃
CH ₂ Cl ₂ /EtOH 9:1	Rf ₄

Per la rivelazione dei prodotti su lastra sono stati usati una lampada UV (gruppi aromatici), l'esposizione ai vapori di iodio (doppi legami), il reattivo al TDM per i legami ammidici [52a].

Flash cromatografia

La "cromatografia flash" [52b] è stata effettuata usando come fase stazionaria il gel di silice 60 Merck (granulometria 40-63 μm). Il campione da purificare è stato caricato in testa alla colonna con due sistemi alternativi: i) disciolto nell'eluente prescelto per la separazione se in esso solubile, ii) adsorbito su gel di silice altrimenti.

Determinazione dei punti di fusione

I punti di fusione sono stati determinati con un apparecchio Leitz modello Laborlux 12 munito di tavolino riscaldante e non sono corretti.

Misure polarimetriche

Le misure polarimetriche sono state effettuate con un polarimetro Perkin-Elmer modello 241 equipaggiato con un termostato Haake modello D8, utilizzando una cella con cammino ottico di 10 cm, alla lunghezza d'onda della riga D del sodio (589 nm).

Modulazione della permeabilità di membrane lipidiche artificiali

Le misure di modulazione della permeabilità di membrane lipidiche artificiali sono state eseguite seguendo il rilascio di CF da vescicole unilamellari (SUV) di fosfatidilcolina/colesterolo 7:3 secondo il seguente metodo: a una soluzione 7.8 mM di ePC (5 ml) in CH₂Cl₂ distillato sono stati aggiunti 368 μ l di una soluzione di Ch 45.38 mM in CH₂Cl₂ distillato. La miscela lipidica (ePC:Ch 7:3 in moli) è stata seccata facendo fluire azoto e ponendo in essiccatore, sotto vuoto, per oltre 3 ore. È stata preparata una soluzione di carbossifluoresceina 50 mM in tampone Hepes sciogliendo 113 mg di carbossifluoresceina (Fluka, utilizzata senza ulteriori purificazioni) in 4 ml di acqua; sono state aggiunte alcune gocce di NaOH 1N fino a pH ~7.4, 1 ml di tampone Hepes 30 mM a pH 7.4 e quindi 1 ml di acqua. Il pH finale era compreso tra 7.4 e 7.5. La miscela lipidica è stata idratata con 6 ml di CF 50 mM mescolando a lungo con una bacchetta di vetro. La sospensione lipidica è stata lasciata riposare a temperatura ambiente e al buio per 15 ore. Il giorno successivo la soluzione è stata sonicata a 0° C per 45 minuti. Le vescicole SUV sono state separate dalla carbossifluoresceina non incapsulata mediante "gel filtration" su colonna di Sephadex G-75 (diametro colonna 2 cm, altezza della fase stazionaria 60 cm), usando come eluente la soluzione di Hepes 50 mM, pH 7.4. È stato calcolato il fattore di diluizione per la soluzione lipidica. La concentrazione totale di lipidi è stata mantenuta costante per tutti gli esperimenti ([ePC+Ch] 6·10⁻⁵ M) che sono stati eseguiti in cuvette in PVC (1 cm x 1 cm) contenenti 2.5 ml di sospensione lipidica, misurando, mediante fluorescenza, la CF rilasciata a diversi rapporti

$$R^{-1} = \frac{[peptide]}{[lipide]}$$

ottenuti aggiungendo aliquote di una soluzione metanolica del peptide.

Le misure di fluorescenza sono state eseguite su uno spettrofluorimetro Perkin-Elmer MPF-66 a 20° C, λ_{exc} 488 nm (ampiezza banda 2.5 nm), λ_{em} 520 nm (ampiezza banda 2.5 nm). La percentuale di CF rilasciata al

tempo t è stata determinata come

$$CF = \frac{F_t - F_0}{F_T - F_0} \cdot 100$$

dove F_0 : intensità di fluorescenza delle vescicole in assenza del peptide;
 F_t : intensità di fluorescenza al tempo t in presenza del peptide;
 F_T : intensità totale di fluorescenza determinata distruggendo le vescicole mediante addizione di 50 μ l di Triton X-100 al 10% in acqua.

Le cinetiche sono state interrotte dopo 20 minuti.

HPLC

Le analisi HPLC sono state effettuate sui due peptidi finali sbloccati per verificarne la purezza. Si è usato il cromatografo Dionex, serie P680, dotato di camera per degasare i solventi; autocampionatore Dionex, serie ASI-100; rivelatore Dionex, Softron GmbH operante a 215 nm; interfacciato ad un computer. È stata utilizzata la colonna analitica a fase inversa C₁₈ 218TP104 (250 x 4.6 mm, flusso di 1.5 mL/min, 10 μ m di diametro) della Vydac.

Come eluente si è fatto uso di una miscela dei seguenti solventi:

A: H₂O-TFA 0.1% v/v.

B: CH₃CN90%-H₂O10%-TFA 0.1% v/v/v.

Dicroismo circolare

Le misure di dicroismo circolare sono state registrate con il dicrografo Jasco modello J-715, utilizzando celle di quarzo (Hellma) con cammino ottico di 0.02cm. I valori sono espressi in ellitticità molare (gradi x cm² x dmol⁻¹) :

$$[\Theta]_T = (PM \cdot \Theta) / (l \cdot c) = 3300 \cdot \Delta\epsilon = 3300 \cdot (\epsilon_L - \epsilon_R)$$

dove:

Θ ellitticità osservata

PM	peso molecolare totale del peptide
l	lunghezza del cammino ottico in cm.
c	concentrazione in gr/l
$\Delta\epsilon$	differenza tra i coefficienti di estinzione della luce polarizzata sinistrogira e destrogira, rispettivamente.

Spettrometria di massa

Gli spettri di massa sono stati registrati con uno spettrometro di massa a tempo di volo, *time of flight* (Mariner modello ESI-TOF, Perseptive Biosystems), usando come tecnica di ionizzazione l'ESI. Gli ioni positivi o negativi formati sono stati accelerati a 10, 15, 20 o 30 keV e analizzati in modo lineare.

Spettroscopia ultravioletta

Gli spettri di assorbimento UV sono stati acquisiti con uno spettrofotometro Shimadzu interfacciato con un computer. Sono state utilizzate delle celle in quarzo con cammino ottico di 1.0cm. Questa spettroscopia è stata utilizzata per determinare, attraverso la legge di Lambert-Beer, la concentrazione delle soluzioni adoperate poi per gli studi di dicroismo circolare.

Spettroscopia di assorbimento IR

Gli spettri di assorbimento IR allo stato solido, in pastiglia di KBr, sono stati ottenuti utilizzando uno spettrofotometro Perkin-Elmer modello 580 B equipaggiato con una "IR data station" Perkin-Elmer 3600. Gli spettri di assorbimento IR in deuterochloroformio (99.8% d_2 ; Fluka) sono stati ottenuti utilizzando uno spettrofotometro Perkin-Elmer FT-IR modello 1720X operante in trasformata di Fourier, interfacciato ad un personal computer IBM PS/2 modello 50 Z, e celle di cammino ottico di 0.1, 1.0 e 10.0 mm con finestre in CaF_2 . Per ogni spettro sono state eseguite 50 scansioni alla risoluzione nominale di 4 cm^{-1} e con acquisizione digitalizzata del segnale a intervalli di 1 cm^{-1} , utilizzando un "sample

shuttle" che consente l'acquisizione alternata del campione e del fondo strumentale. Gli spettri del solvente sono stati ottenuti nelle stesse condizioni ed utilizzando le stesse celle impiegate per i campioni. Allo scopo di minimizzare i contributi del vapore d'acqua atmosferico, il banco ottico ed il vano campioni dello strumento sono stati mantenuti sotto un flusso costante di azoto. Le posizioni dei massimi di assorbimento, di spalle e di bande parzialmente sovrapposte sono state determinate con l'ausilio della derivata seconda. Le elaborazioni spettrali (sottrazione del solvente e derivatizzazione) sono state effettuate con il programma SpectraCalc della Galactic (Salem, USA).

Spettroscopia NMR

Gli spettri ^1H -NMR sono stati registrati con gli spettrometri Bruker AC modelli 200, AC 250, AM 400 e 600 MHz. Come solventi sono stati usati il deuterocloroformio (99.96% d_2 ; *Aldrich*) e il dimetilsolfossido (99.96% d_6 , *Acros*) e il metanolo deuterato CD_3OH (99% d_3 ; *Aldrich*). Gli spostamenti chimici sono espressi in parti per milione (δ) rispetto al segnale del tetrametilsilano. Le costanti di accoppiamento sono misurate in Hertz. Le molteplicità dei picchi sono espresse come *s* (singoletto), *d* (doppietto), *t* (tripletto), *dd* (doppietto di doppietti) e *m* (multipletto).

II.2 Sintesi e Caratterizzazione:

Oltre ai prodotti di seguito descritti si sono utilizzati altri derivati di amminoacidi precedentemente sintetizzati nel nostro laboratorio:

- Z-Gly-OH
- Fmoc-Lys(Z)-OH

II.2.1 Sintesi dei derivati

Z-Leu-OH [53]

Si sciolgono 20.30 g di H-Leu-OH (0.155 mol) in 100 mL di H₂O con 13.0 g di NaHCO₃ (1 eq.). A parte si pesa lo Z-OSu (42.42 g, 1.1 eq.) e lo si scioglie in 50 mL di CH₃CN. Si uniscono i reagenti, per sciogliere eventualmente si aggiunge H₂O e CH₃CN. Viene lasciato a reagire per 2 giorni. Si evapora il CH₃CN a pressione ridotta e si aggiunge NaHCO₃ fino a pH basico, quindi si estrae lo Z-OSu non reagito con Et₂O. Si acidifica fino a pH=3 con KHSO₄ ed si estrae il prodotto con AcOEt (5x50mL). Si lava quindi la fase organica 2 volte con una soluzione al 5% di KHSO₄ e 4 volte con H₂O. Si anidrifica con NaSO₄, si filtra e si tira a secco. Rimane un olio.

Resa : 95%.

Rf₁ : 0.80 **Rf₂** : 0.95

[α]_D²⁰: -14.7° (c=0.5, MeOH).

IR (film): 3325, 1714, 1532 cm⁻¹.

¹H NMR (200 MHz, CDCl₃): δ 7.34 [m, 5H, Z fenile CH], 5.45 [sb, 1H, Leu NH], 5.13 [s, 2H, Z CH₂], 4.46-4.19 [m, 1H, Leu α-CH], 1.83-1.47 [m, 3H, Leu β-CH₂, Leu γ-CH], 1.00-0.80 [m, 6H, Leu 2 d-CH₃].

HCl·H-Leu-OMe [54]

Si raffredda del MeOH anidro a -40°C e si aggiunge lentamente e sotto agitazione 12.00 mL di SOCl₂ e H-Leu-OH. La soluzione viene riportata lentamente a T°_{AMB} e successivamente portata a riflusso per 5 ore. Si tira a secco il MeOH e si riprende più volte con Et₂O

Resa : 102%

Punto di fusione : 150 – 151 °C

Rf₁ : 0.65 **Rf₂** : 0.70 **Rf₃** : 0.15

IR (*KBr*): 3388, 1736, 1588 cm^{-1}

$[\alpha]_{\text{D}}^{20}$: 20.5° ($c = 0.5$, MeOH)

$^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, D_2O): δ 4.01 [m, 1H, Leu α -CH], 3.70 [s, 3H, OMe CH_3], 1.77-1.50 [m, 3H, Leu β - CH_2 , Leu α -CH], 0.84 e 0.81 [2d, 6H, 2 Leu δ - CH_3]

Z-Aib-OH [55a]

Si sciolgono 20.30 g di H-Aib-OH (0.197 mol) in 100 mL di H_2O con 16.53 g di NaHCO_3 (1 eq.). A parte si pesa lo Z-OSu (53,95 g, 1.1 eq.) e lo si scioglie in 50 mL di CH_3CN . Si uniscono i reagenti, per sciogliere eventualmente si aggiunge H_2O e CH_3CN . Viene lasciato a reagire per 2 giorni. Si evapora il CH_3CN a pressione ridotta e si aggiunge NaHCO_3 fino a pH basico, quindi si estrae lo Z-OSu non reagito con Et_2O . Si acidifica fino a pH=3 con KHSO_4 ed si estrae il prodotto con AcOEt (5x50mL). Si lava quindi la fase organica 2 volte con una soluzione al 5% di KHSO_4 e 4 volte con H_2O . Si anidrifca con NaSO_4 , si filtra e si tira a secco. Il prodotto precipita da AcOEt/Etere di Petrolio.

Resa : 69%

Punto di fusione : 84 – 85 °C

R_{f1} : 0.65 **R_{f2}** : 0.90

IR (*KBr*): 3320, 1718, 1672, 1550 cm^{-1}

$^1\text{H-NMR}$ (200MHz, CDCl_3): δ 7.34 [m, 5H, Z-fenile CH], 5.41 [s, 1H, NH], 5.10 [s, 2H, Z CH_2], 1.57 [s, 6H, β - CH_3]

Z-Aib-OtBu [55a]

Si raffreddano 20.0 g di Z-Aib-OH sciolti in CH_2Cl_2 a -70°C. Vi si gorgogliano 96.2 mL (12 eq.) di isobutene e si aggiungono 0.84 mL di H_2SO_4 (0.01 mL/mmol). In contenitore sigillato si lascia che la miscela raggiunga la T_{AMB}° e si lascia reagire per 7 giorni. Si riporta la bottiglia a -70°C e si versa il contenuto in 200 mL di soluzione di NaHCO_3 al 5%. Dopo alcune ore si recupera il prodotto dalla fase organica e si lava con CH_2Cl_2 . Si tira a secco e si riprende con AcOEt. Si lava con una soluzione di KHSO_4 al 5%, poi con H_2O , poi NaHCO_3 al 5% ed infine con H_2O . Si anidrifca, si filtra e tirato a secco precipita da AcOEt/Etere di petrolio.

Resa : 82%

Punto di fusione : 75 – 77 °C

R_{f1} : 0.95 **R_{f2}** : 0.95 **R_{f3}** : 0.69

IR (KBr): 3370, 1712, 1519 cm^{-1}

$^1\text{H-NMR}$ (200MHz, CDCl_3): δ 7.33 [m, 5H, Z-fenile CH], 5.45 [s, 1H, NH], 5.08 [s, 2H, Z CH_2], 1.51 [s, 6H, Aib $\beta\text{-CH}_3$], 1.43 [s, 9H, OtBu 3 CH_3]

Z-Ile-OH [56]

Si sciolgono 10.00 g di H-Ile-OH (0.076 mol) in 50 mL di H_2O con 6.39 g di NaHCO_3 (1 eq.). A parte si pesa lo Z-OSu (20.91 g, 1.1 eq.) e lo si scioglie in 25 mL di CH_3CN . Si uniscono i reagenti, per sciogliere eventualmente si aggiunge H_2O e CH_3CN . Viene lasciato a reagire per 2 giorni. Si evapora il CH_3CN a pressione ridotta e si aggiunge NaHCO_3 fino a pH basico, quindi si estrae lo Z-OSu non reagito con Et_2O . Si acidifica fino a pH=3 con KHSO_4 ed si estrae il prodotto con AcOEt (5x50mL). Si lava quindi la fase organica 2 volte con una soluzione al 5% di KHSO_4 e 4 volte con H_2O . Si anidrifica con NaSO_4 , si filtra e si tira a secco. Si ottiene un olio.

Resa : 95%

Rf₁ : 0.50 **Rf₂** : 0.95

IR (film): 3328, 1715, 1523 cm^{-1}

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 200 MHz): δ 7.34 (m, 5H, Z-fenile CH); 5.25 (d, 1H, NH); 5.12 (s, 2H, Z- CH_2); 4.40 (dd, 1H, $\alpha\text{-CH}$); 1.95 (m, 1H, $\beta\text{-CH}$); 1.47 e 1.23 (2m, 2H, $\gamma\text{-CH}_2$); 0.98 (d, 3H, $\gamma\text{-CH}_3$); 0.93 (t, 3H, $\delta\text{-CH}_3$)

Fmoc-Aib-OH

Si sciolgono 10.00 g di H-Aib-OH (0.097 mol) in 50 mL di H_2O con 13.5 mL di TEA (1 eq.). A parte si pesa lo Fmoc-OSu (32.71 g, 1.0 eq.) e lo si scioglie in 25 mL di CH_3CN . Sciogliere bene i reagenti. Si uniscono i reagenti, per sciogliere eventualmente si aggiunge H_2O e CH_3CN . Controllare che il pH sia basico ma non superiore a 8; se dalla miscela si forma un precipitato aggiungere CH_3CN fino a completa dissoluzione. La miscela viene lasciata a reagire per 2 giorni. Si evapora il CH_3CN a pressione ridotta, quindi si estrae lo Z-OSu non reagito con Et_2O . Si acidifica fino a pH=3 con KHSO_4 ed si estrae il prodotto con AcOEt (5x50mL). Si lava quindi la fase organica 2 volte con una soluzione al 5% di KHSO_4 e 4 volte con H_2O . Si anidrifica con NaSO_4 , si filtra e si tira a secco. Il prodotto precipita da AcOEt/Etere di Petrolio.

Resa : 44%

Punto di fusione : 178 – 180 °C

Rf₁ : 0.50 **Rf₂** : 0.95 **Rf₃** : 0.30

IR (KBr): 3300, 1692, 1543 cm⁻¹

¹H-NMR (200 MHz, CDCl₃): δ 7.76 [d, 2H, Fmoc CH ar.], 7.60 [d, 2H, Fmoc CH ar.], 7.44-7.29 [m, 4H, Fmoc CH ar.], 5.58 [s, 1H, Aib NH], 4.41 [d, 2H, Fmoc CH₂], 4.22 [t, 1H, Fmoc CH], 1.58 [s, 6H, Aib CH₃].

II.2.2 Sintesi del segmento A

Z-Ile-Leu-OMe [57a]

Ad una soluzione di Z-Ile-OH (8.03g, 1.1eq.) e HOBt (4.09g, 1.1eq.) in CH₂Cl₂ anidro raffreddata a 0°C si aggiungono 5.80g (1.1eq.) di EDC, poi 5.0g (1 eq.) di HCL-H-Leu-OMe e 3.03 (1 eq.) mL di NMM. Si controlla che il pH rimanga 8.0 e si lascia la miscela di reazione sotto agitazione a T°_{AMB} per una notte. Viene evaporato il solvente, si riprende con AcOEt e si lava con una soluzione di KHSO₄ al 5%, poi con H₂O, poi NaHCO₃ al 5% ed infine con H₂O. Si anidrifica, si filtra e tirato a secco precipita da AcOEt/Etere di petrolio.

Resa: 95%

Punto di fusione: 116-117 °C.

Rf₁: 0.90, **Rf₂**: 0.95, **Rf₃**: 0.50.

[α]_D²⁰: -41.4° (c = 0.5, MeOH).

IR (KBr): 3307, 1750, 1689, 1647, 1538 cm⁻¹.

¹H NMR (200 MHz, CDCl₃): δ 7.33 [m, 5H, Z fenile CH], 6.12 [d, 1H, Leu NH], 5.32 [d, 1H, Ile NH], 5.11 [s, 2H, Z CH₂], 4.61 [m, 1H, Leu a-CH], 4.03 [m, 1H, Ile a-CH], 3.73 [s, 3H, OMe CH₃], 1.72 [m, 1H, Ile b-CH] 1.70-1.40 [m, 4H, Leu b-CH₂, Leu g-CH, 1H Ile g-CH₂], 1.16 [m, 1H, Ile g-CH₂], 1.00-0.80 [m, 12H, Leu 2 d-CH₃, Ile g-CH₃, Ile d-CH₃].

Z-Gly-Ile-Leu-OMe [57b]

Sblocco di Z-Ile-Leu-OMe

Si sciolgono 3.00g di Z-Ile-Leu-OMe in MeOH, si disarea con N₂ e si introduce il 10% m/m di Pd/C (0.3 g). Si lascia reagire per circa 30' sotto flusso di H₂, seguendo la reazione con TLC. A fine reazione si filtra via il catalizzatore su celite. Il tutto viene tirato a secco.

Coupling:

Alla soluzione di Z-Gly-OH (1.80g, 1.1eq.) e HOBt (1.15g, 1.1eq.) in CH₂Cl₂

anidro raffreddata a 0°C si aggiungono 1.65g (1.1eq.) di EDC, poi si unisce all'H-Ile-Leu-OMe (1 eq.) ottenuto dallo sblocco precedente e 0.84mL (1 eq.) di NMM. Si controlla che il pH rimanga 8.0 e si lascia la miscela di reazione sotto agitazione a T°_{AMB} per una notte. Viene evaporato il solvente, si riprende con AcOEt e si lava con una soluzione di KHSO₄ al 5%, poi con H₂O, poi NaHCO₃ al 5% ed infine con H₂O. Si anidrifica, si filtra e tirato a secco precipita da AcOEt/Etere di petrolio.

Resa: 31%

Punto di fusione: 119-120 °C.

R_{f1}: 0.85, **R_{f2}:** 0.95, **R_{f3}:** 0.30.

[α]_D²⁰: -45.9° (c = 0.5, MeOH).

IR (KBr): 3290, 1745, 1703, 1676, 1637, 1537 cm⁻¹.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): d 7.35 [m, 5H, Z fenile CH], 6.64 [d, 1H, Ile NH], 6.35 [d, 1H, Leu NH], 5.48 [t, 1H, Gly NH], 5.13 [s, 2H, Z CH₂], 4.58 [m, 1H, Leu α-CH], 4.34 [m, 1H, Ile α-CH], 3.90 [m, 2H, Gly α-CH₂], 3.72 [s, 3H, OMe CH₃], 1.85 [m, 1H, Ile β-CH], 1.70-1.40 [m, 4H, Leu β-CH₂, Leu γ-CH, 1H Ile γ-CH₂], 1.13 [m, 1H, Ile γ-CH₂], 1.00-0.80 [m, 12H, Leu 2 d-CH₃, Ile γ-CH₃, Ile δ-CH₃].

II.2.3 Sintesi del segmento B

Z-Leu-Aib-OtBu

Sblocco di Z-Aib-OtBu

Si sciolgono 4.65g di Z-Aib-OtBu in CH₂Cl₂ anidro, si disarea con N₂ e si introduce il 20% m/m di Pd/C (0.93 g). Si lascia reagire per qualche ora sotto flusso di H₂, seguendo la reazione con TLC. A fine reazione si filtra via il catalizzatore su celite. Il tutto viene tirato a secco a freddo.

Coupling:

Alla soluzione di Z-Leu-OH (4.63g, 1.1eq.) e HOAt (2.37g, 1.1eq.) in CH₂Cl₂ anidro raffreddata a 0°C si aggiungono 3.34g (1.1eq.) di EDC, poi l'H-Aib-OtBu (1 eq.) ottenuto dallo sblocco precedente e 1.75 (1 eq.) mL di NMM. Si controlla che il pH rimanga 8.0 e si lascia la miscela di reazione sotto agitazione a T°_{AMB} per una notte. Viene evaporato il solvente, si riprende con AcOEt e si lava con una soluzione di KHSO₄ al 5%, poi con H₂O, poi NaHCO₃ al 5% ed infine con H₂O. Si anidrifica, si filtra e tirato a secco precipita da AcOEt/Etere di petrolio.

Resa : 73%

Punto di fusione : 79 – 81 °C

Rf₁ : 0.90 **Rf₂** : 0.85 **Rf₃** : 0.70

IR (KBr): 3342, 3289, 1724, 1711, 1673, 1543 cm⁻¹

[α]_D²⁰ : -30.2° (c = 0.5, MeOH).

¹H-NMR (200 MHz, CDCl₃): (200MHz, CDCl₃): δ 7.35 [m, 5H, Z fenile CH], 6.60 [s, 1H, Aib NH], 5.19 [d, 1H, Leu NH] 5.11 [s, 2H, Z CH₂], 4.12 [m, 1H, Leu α-CH], 1.66 [m, 3H; 2H Leu β-CH₂, 1H Leu α-CH], 1.51 [m, 6H, 2 Aib α-CH₃], 1.44 [s, 9H, OtBu 3 CH₃], 0.93 [d, 6H, Leu δ-CH₃]

Z-Gly-Leu-Aib-OtBu

Sblocco di Z-Leu-Aib-OtBu

Si sciolgono 3.97g di Z-Leu-Aib-OtBu in MeOH, si disarea con N₂ e si introduce il 10% ^m/_m di Pd/C (0.4 g). Si lascia reagire per circa 30' sotto flusso di H₂, seguendo la reazione con TLC. A fine reazione si filtra via il catalizzatore su celite. Il tutto viene tirato a secco.

Coupling:

Alla soluzione di Z-Gly-OH (2.25g, 1.1eq.) e HOBt (1.45g, 1.1eq.) in CH₂Cl₂ anidro raffreddata a 0°C si aggiungono 2.06g (1.1eq.) di EDC, poi si unisce all'H-Leu-Aib-OtBu (1 eq.) ottenuto dallo sblocco precedente e 1.10mL (1 eq.) di NMM. Si controlla che il pH rimanga 8.0 e si lascia la miscela di reazione sotto agitazione a T°_{AMB} per un paio di giorni. Viene evaporato il solvente, si riprende con AcOEt e si lava con una soluzione di KHSO₄ al 5%, poi con H₂O, poi NaHCO₃ al 5% ed infine con H₂O. Si anidrifica, si filtra e tirato a secco. Purificazione con cromatografia flash in eluente AcOEt:EP 1:1. Ricristallizza da AcOEt/Etere di petrolio.

Resa : 79%

Punto di fusione: 112 – 114 °C

Rf₁: 0.80 **Rf₂**: 0.65 **Rf₃**: 0.50

[α]_D²⁰: -39.0° (c = 0.5, MeOH).

IR (KBr): 3324, 1731, 1705, 1659, 1546 cm⁻¹

¹H NMR (200MHz, CDCl₃): δ 7.33 [m, 5H, Z fenile CH], 6.85 [s, 1H, Aib NH], 6.79 [d, 1H, Leu NH], 5.70 [t, 1H, Gly NH], 5.10 [s, 2H, Z CH₂], 4.40 [m, 1H, Leu α-CH], 3.86 [t, 2H, Gly α-CH₂], 1.58 [m, 3H; 2H Leu β-CH₂, 1H Leu γ-CH], 1.51 [2s, 6H, 2 Aib β-CH₃], 1.43 [s, 9H, OtBu 3 CH₃], 0.91 [d, 6H, Leu δ-CH₃]

Z-Gly-Gly-Leu-Aib-OtBu

Sblocco di Z-Gly-Leu-Aib-OtBu

Si sciolgono 5.60g di Z-Gly-Leu-Aib-OtBu in MeOH, si disarea con N₂ e si introduce il 10% ^{m/m} di Pd/C (0.56 g). Si lascia reagire per circa 30' sotto flusso di H₂, seguendo la reazione con TLC. A fine reazione si filtra via il catalizzatore su celite. Il tutto viene tirato a secco.

Coupling:

Alla soluzione di Z-Gly-OH (3.17g, 1.1eq.) e HOBt (2.05g, 1.1eq.) in CH₂Cl₂ anidro raffreddata a 0°C si aggiungono 2.90g (1.1eq.) di EDC, poi si unisce all'H-Gly-Leu-Aib-OtBu (1 eq.) ottenuto dallo sblocco precedente e 1.50mL (1 eq.) di NMM. Si controlla che il pH rimanga 8.0 e si lascia la miscela di reazione sotto agitazione a T°_{AMB} per un paio di giorni. Viene evaporato il solvente, si riprende con AcOEt e si lava con una soluzione di KHSO₄ al 5%, poi con H₂O, poi NaHCO₃ al 5% ed infine con H₂O. Si anidrifca, si filtra e tirato a secco. Purificazione com cromatografia flash in eluente AcOEt:EP 12:1. Ricristallizza da AcOEt/Etere di petrolio.

Resa : 61%**Punto di fusione** : 67 – 68 °C**Rf₂** : 0.95 **Rf₃** : 0.42 **Rf₄** : 0.73**IR (KBr)**: 3312, 1732, 1711, 1651, 1535 cm⁻¹**[α]_D²⁰** : -22.1° (c=0.5, MeOH)

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 7.35 [m, 5H, Z fenile CH], 6.94 [t, 1H, Gly² NH], 6.81 [s, 1H, Aib NH], 6.67 [t, 1H, Leu NH], 5.61 [t, 1H, Gly¹ NH], 5.13[s, 2H, CH₂Z], 1.63 [m, 3H, 2H Leu β-CH₂, 1H Leu γ-CH], 1.43 [s, 9H, OtBu 3 CH₃], 0.92 [m, 6H, Leu δ-CH₃]

II.2.4 Sintesi del segmento C**Z-Aib-Gly-Leu-Aib-OtBu**

Sblocco di Z-Gly-Leu-Aib-OtBu

Si sciolgono 1.00g di Z-Gly-Leu-Aib-OtBu in MeOH, si disarea con N₂ e si introduce il 10% ^{m/m} di Pd/C (0.10 g). Si lascia reagire per circa 30' sotto flusso di H₂, seguendo la reazione con TLC. A fine reazione si filtra via il catalizzatore su celite. Il tutto viene tirato a secco.

Coupling:

Alla soluzione di Z-Aib-OH (0.56g, 1.1eq.) e HOAt (0.32g, 1.1eq.) in CH_2Cl_2 anidro raffreddata a 0°C si aggiungono 0.45g (1.1eq.) di EDC, poi si unisce all'H-Gly-Leu-Aib-OtBu (1 eq.) ottenuto dallo sblocco precedente e 0.24mL (1 eq.) di NMM. Si controlla che il pH rimanga 8.0 e si lascia la miscela di reazione sotto agitazione a T°_{AMB} per un paio di giorni. Viene evaporato il solvente, si riprende con AcOEt e si lava con una soluzione di KHSO_4 al 5%, poi con H_2O , poi NaHCO_3 al 5% ed infine con H_2O . Si anidrifica, si filtra e tirato a secco. Ricristallizza da AcOEt/Etere di petrolio.

Resa : 90%**Punto di fusione:** 165-166 $^\circ\text{C}$.**Rf₁:** 0.50, **Rf₂:** 0.80, **Rf₃:** 0.30. **$[\alpha]_D^{20}$** = -3.2 $^\circ$ (c=0.5, MeOH).**IR** (KBr): 3316, 1732, 1701, 1659, 1536 cm^{-1} . **^1H NMR** (200MHz, CDCl_3): δ 7.36 [m, 6H, Z fenile CH, 1H NH], 6.93 [m, 1H, NH], 6.87 [s, 1H, Aib NH], 5.37 [s, 1H, Aib NH], 5.10 [2d, 2H, Z CH_2], 4.42 [m, 1H, Leu α -CH], 3.93 [d, 2H, Gly α - CH_2], 1.70-1.68 [m, 3H, 2H Leu β - CH_2 , 1H Leu γ -CH], 1.50-1.48 [m, 12H, 2 Aib 2 β - CH_3], 1.42 [s, 9H, OtBu 3 CH_3], 0.91 [m, 6H, 2 Leu δ - CH_3].**II.2.5 Sintesi del segmento D****Fmoc-Lys(Z)-Ile-Leu-OMe**

Sblocco di Z-Ile-Leu-OMe

Si sciolgono 0.5g di Z-Ile-Leu-OMe in MeOH, si disarea con N_2 e si introduce il 10% m/m di Pd/C (0.05 g). Si lascia reagire per circa 30' sotto flusso di H_2 , seguendo la reazione con TLC. A fine reazione si filtra via il catalizzatore su celite. Il tutto viene tirato a secco.

Coupling:

Alla soluzione di Fmoc-Lys(Z)-OH (0.71g, 1.1eq.) e HOBt (0.19g, 1.1eq.) in CH_2Cl_2 anidro raffreddata a 0°C si aggiungono 0.18g (1.1eq.) di EDC, poi si unisce all'H-Ile-Leu-OMe (1 eq.) ottenuto dallo sblocco precedente e 0.14mL (1 eq.) di NMM. Si controlla che il pH rimanga 8.0 e si lascia la miscela di reazione sotto agitazione a T°_{AMB} per un paio di giorni. Viene evaporato il solvente, si riprende con AcOEt e si lava con una soluzione di KHSO_4 al 5%, poi con H_2O , poi NaHCO_3

al 5% ed infine con H₂O. Si anidrifica, si filtra e tirato a secco. Ricristallizza da AcOEt/Etere di petrolio.

Resa : 81%

Punto di fusione : 192 – 194 °C

Rf₂ : 0.95 **Rf₃** : 0.67 **Rf₄** : 0.96

IR (KBr): 3294, 1693, 1642, 1536 cm⁻¹

[α]_D²⁰ : non misurato; si scioglie a fatica, resta torbido

¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃): δ 7.75 [d, 2H, Fmoc], 7.58 [t, 2H, Fmoc], 7.49[m, 2H, Fmoc], 7.32 [m, 5H, Z fenile CH], 6.64 [d, 1H, NH], 6.36 [d, 1H, NH], 5.96 [d, 1H, NH], 5.07 [m, 2H, CH₂ uretanici], 4.60 [s, 1H, Lys ε-NH], 4.39 [m, 2H, CH₂ uretanici], 4.29 [t, 1H, α-CH], 4.20 [m, 2H, α-CH], 3.70 [s, 3H, OMe CH₃], 3.20 [d, 2H, Lys ε-CH₂], 1.38 [s, 1H, Ile γ-CH], 0.89 [m, 12H, 6H Leu δ-CH₃, 3H Ile δ-CH₃, 3H Ile γ-CH₃]

II.2.6 Sintesi del segmento E

Fmoc-Lys(Z)-Leu-Aib-OtBu

Sblocco di Z-Leu-Aib-OtBu

Si sciolgono 4.0g di Z-Leu-Aib-OtBu in MeOH, si disarea con N₂ e si introduce il 10% ^m/_m di Pd/C (0.40 g). Si lascia reagire per circa 30' sotto flusso di H₂, seguendo la reazione con TLC. A fine reazione si filtra via il catalizzatore su celite. Il tutto viene tirato a secco.

Coupling:

Alla soluzione di Fmoc-Lys(Z)-OH (5.45g, 1.1eq.) e HOBt (1.46g, 1.1eq.) in CH₂Cl₂ anidro raffreddata a 0°C si aggiungono 2.07g (1.1eq.) di EDC, poi si unisce all'H-Leu-Aib-OtBu (1 eq.) ottenuto dallo sblocco precedente e 1.08mL (1 eq.) di NMM. Si controlla che il pH rimanga 8.0 e si lascia la miscela di reazione sotto agitazione a T[°]_{AMB} per un paio di giorni. Viene evaporato il solvente, si riprende con AcOEt e si lava con una soluzione di KHSO₄ al 5%, poi con H₂O, poi NaHCO₃ al 5% ed infine con H₂O. Si anidrifica, si filtra e tirato a secco. Ricristallizza da AcOEt/Etere di petrolio.

Nota: decisamente più solubile di Fmoc-Lys(Z)-Ile-Leu-OMe

Resa : 95%

Punto di fusione : 114 – 117 °C

Rf₂ : 0.95 **Rf₃** : 0.68 **Rf₄** : 0.97

IR (KBr): 3302, 1694, 1643, 1533 cm⁻¹

$[\alpha]_D^{20}$: -30.4° (c=0.5, MeOH)

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 7.75 [d, 2H, Fmoc], 7.58 [d, 2H, Fmoc], 7.39 [t, 2H, Fmoc], 7.32 [s, 5H, Z fenile CH], 6.67 [s, 1H, Aib NH], 6.41 [d, 1H, Leu NH], 5.58 [d, 1H, Lys NH], 5.12 [s, 2H, CH₂ uretanici], 4.38 [m, 3H, 2H CH₂ uretanici, 1H Lys ε-NH], 4.12 [m, 2H, 1H Lys α-CH, 1H Leu α-CH], 3.18 [d, 2H, Lys ε-CH₂], 1.86 [s, 6H, 2H Lys β-CH₂, 2H Lys γ-CH₂, 2H Lys δ-CH₂], 1.64 [m, 3H, 1H Leu γ-CH, 2H Leu β-CH₂], 1.47 [m, 6H, Aib β-CH₃], 1.43 [s, 9H, OtBu CH₃], 0.91 [t, 6H, Leu δ-CH₃].

Fmoc-Aib-Lys(Z)-Leu-Aib-OtBu

Sblocco di Fmoc-Lys(Z)-Leu-Aib-OtBu

Si sciolgono 4.50g (1 eq.) di peptide in 50 mL di CH₂Cl₂ anidro e quindi si aggiungono 12.34 mL di DEA (20 eq.). Si segue lo sblocco con TLC (AcOEt:EP 1:1). A sblocco terminato si evapora la DEA in evaporatore rotante e si fanno da due lavaggi con Et₂O. Si esegue una cromatografia flash con solo CH₂Cl₂ in partenza, cui viene fatto seguire un gradiente fino a CH₂Cl₂:EtOH 15:1. Resa: ottenuto oltre il 100% di resa, probabilmente dovuto a residui di solvente. Per gli equivalenti nel coupling considero 100%.

Coupling:

Alla soluzione di Fmoc-Aib-OH (2.16g, 1.1eq.) e HOAt (0.89g, 1.1eq.) in CH₂Cl₂ anidro raffreddata a 0°C si aggiungono 1.25g (1.1eq.) di EDC, poi si unisce all'H-Lys(Z)-Leu-Aib-OtBu (1 eq.) ottenuto dallo sblocco precedente e 0.66mL (1 eq.) di NMM. Si controlla che il pH rimanga 8.0 e si lascia la miscela di reazione sotto agitazione a T°_{AMB} per un paio di giorni. Viene evaporato il solvente, si riprende con AcOEt e si lava con una soluzione di KHSO₄ al 5%, poi con H₂O, poi NaHCO₃ al 5% ed infine con H₂O. Si anidrifica, si filtra e tirato a secco. Purificazione con cromatografia flash in eluente AcOEt:EP 6:1. Si è ottenuto un olio.

Resa : 62%

Rf₂ : 0.95 **Rf₃** : 0.49 **Rf₄** : 0.86

IR (KBr): 3317, 1700, 1658, 1525 cm⁻¹

$[\alpha]_D^{20}$: -21.5° (c=0.5, MeOH)

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 7.77 [d, 2H, Fmoc], 7.56 [t, 2H, Fmoc], 7.40 [t, 2H, Fmoc], 7.31 [m, 5H, Z fenile CH], 7.26 [m, 1H, NH], 6.87 [s, 1H, NH], 6.67 [m, 1H, NH], 5.00 [m, 3H, 2H CH₂ uretanici, 1H NH], 4.58 [m, 1H, α-CH], 4.37 [m, 1H, α-CH], 4.13 [m, 2H, CH₂ uretanici], 0.82 [m, 6H, Leu δ-CH₃].

II.2.7 Condensazione dei segmenti A e B

Z-Gly-Gly-Leu-Aib-Gly-Ile-Leu-OMe [57b]

Sblocco del terz-butil-estere Z-Gly-Gly-Leu-Aib-OtBu

1.43 mL di TFA (10 eq.) vengono aggiunti goccia a goccia ad una soluzione, in bagno a ghiaccio, di 1.00g di peptide (1 eq.) sciolti in CH₂Cl₂ (volume solvente uguale a quello del TFA da aggiungere). Si lascia reagire per un'ora, controllandone il decorso con TLC. Tirando a secco si ottiene un olio; dopo diversi lavaggi con Et₂O il TFA evapora completamente lasciando un solido che si filtra su gooch. Resa: 99%

Sblocco di Z-Gly-Ile-Leu-OMe

Si sciolgono 0.86g (1 eq.) di Z-Gly-Ile-Leu-OMe in MeOH, si disarea con N₂ e si introduce il 10% ^m/_m di Pd/C (0.09 g). Si lascia reagire per circa 30' sotto flusso di H₂, seguendo la reazione con TLC. A fine reazione si filtra via il catalizzatore su celite. Il tutto viene tirato a secco.

Coupling:

Alla soluzione di Z-Gly-Gly-Leu-Aib-OH e HOAt (0.29g, 1.1eq.) in CH₂Cl₂ anidro raffreddata a 0°C si aggiungono 0.40g (1.1eq.) di EDC, poi si unisce all'H-Gly-Ile-Leu-OMe ottenuto dallo sblocco precedente e 0.21mL (1 eq.) di NMM. Si controlla che il pH rimanga 8.0 e si lascia la miscela di reazione sotto agitazione a T°_{AMB} per un paio di giorni. Viene evaporato il solvente, si riprende con AcOEt e si lava con una soluzione di KHSO₄ al 5%, poi con H₂O, poi NaHCO₃ al 5% ed infine con H₂O. Si anidrifica, si filtra e tirato a secco. Purificazione con cromatografia flash in eluente AcOEt:EtOH 12:1.

Resa : 27%

Punto di fusione: 152-153 °C.

Rf₁: 0.40, **Rf₂**: 0.90, **Rf₃**: 0.10.

[α]_D²⁰: -39.1° (c = 0.5, MeOH).

IR (KBr): 3318, 1734, 1706, 1651, 1540 cm⁻¹.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 8.19 [t, 1H, Gly NH], 7.68 [t, 1H, Gly NH], 7.59 [d, 1H, Ile NH], 7.45 [d, 1H, Leu NH], 7.35 [m, 5H, Z fenile CH], 6.76 [m, 2H, Aib NH, Leu NH], 5.94 [t, 1H, Gly NH], 5.12 [m, 2H, Z CH₂], 4.31-3.26 [m, 2H, Gly α-CH₂], 4.23 [m, 1H, Leu α-CH], 4.21-3.45 [m, 2H, Gly α-CH₂], 4.05 [m, 1H, Leu α-CH], 4.02 [m, 1H, Ile α-CH], 3.91 [m, 2H, Gly α-CH₂], 3.66 [s, 3H, OMe CH₃], 2.10 [m, 1H, Ile β-CH₂].

CH], 1.80-1.40 [m, 7H, 2 Leu b-CH₂, 2 Leu g-CH, 1H Ile g-CH₂], 1.57 [s, 3H, Aib 1 β-CH₃], 1.44 [s, 3H, Aib 1 β-CH₃], 1.13 [m, 1H, 1H Ile g-CH₂], 1.00-0.80 [m, 18H, 2 Leu 4 d-CH₃, Ile g-CH₃, Ile d-CH₃].

II.2.8 Condensazione dei segmenti E e B

Z-Aib-Gly-Leu-Aib-Gly-Gly-Leu-Aib-OtBu

Sblocco del terz-butil-estere Z-Aib-Gly-Leu-Aib-OtBu

1.22 mL di TFA (10 eq.) vengono aggiunti goccia a goccia ad una soluzione, in bagno a ghiaccio, di 0.90g di peptide (1 eq.) sciolti in CH₂Cl₂ (volume solvente uguale a quello del TFA da aggiungere). Si lascia reagire per un'ora, controllandone il decorso con TLC. Tirando a secco si ottiene un olio; dopo diversi lavaggi con Et₂O il TFA evapora completamente lasciando un solido che si filtra su gooch. Resa: 101%

Sblocco di Z-Gly-Gly-Leu-Aib-OtBu

Si sciolgono 0.85g (1 eq.) di Z-Gly-Gly-Leu-Aib-OtBu in MeOH, si disarea con N₂ e si introduce il 10% ^m/_m di Pd/C (0.09 g). Si lascia reagire per circa 30' sotto flusso di H₂, seguendo la reazione con TLC. A fine reazione si filtra via il catalizzatore su celite. Il tutto viene tirato a secco.

Coupling:

Alla soluzione di Z-Aib-Gly-Leu-Aib-OH e HOAt (0.25g, 1.1eq.) in CH₂Cl₂ anidro raffreddata a 0°C si aggiungono 0.34g (1.1eq.) di EDC, poi si unisce all'H-Gly-Gly-Leu-Aib-OtBu ottenuto dallo sblocco precedente e 0.18mL (1 eq.) di NMM. Si controlla che il pH rimanga 8.0 e si lascia la miscela di reazione sotto agitazione a T°_{AMB} per un paio di giorni. Viene evaporato il solvente, si riprende con AcOEt e si lava con una soluzione di KHSO₄ al 5%, poi con H₂O, poi NaHCO₃ al 5% ed infine con H₂O. Si anidrifica, si filtra e tirato a secco. Purificazione con cromatografia flash in eluente AcOEt:EtOH 10:1.

Resa : 56%

Punto di fusione : 111 – 114 °C

Rf₂ : 0.95 **Rf₃** : 0.21 **Rf₄** : 0.45

IR (KBr): 3316, 1733, 1660, 1535 cm⁻¹

[α]_D²⁰ : -10.2° (c=0.5, MeOH)

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 7.90 [t, 1H, Gly NH], 7.81 [d, 1H, Leu NH], 7.52 [t,

1H, Gly NH], 7.49 [m, 1H, Gly NH], 7.35 [m, 5H, Z fenile-CH], 7.26 [s, 1H, Aib NH], 7.11 [d, 1H, Leu NH], 6.90 [s, 1H, Aib NH], 5.82 [s, 1H, Aib NH], 5.10 [m, 2H, Z benzile CH₂], 4.38 [m, 1H, α -CH], 4.05 [m, 2H, 2 α -CH], 3.86 [m, 4H, 4 α -CH], 3.69 [m, 1H, α -CH], 1.72 [m, 6H, 2x2H Leu β -CH₂, 2x1H Leu γ -CH], 1.45 [m, 21H, 9H OtBu CH₃, 2x3H Aib β -CH₃, 2x3H Leu β -CH₃], 0.93 [m, 12H, Leu δ -CH₃].

II.2.9 Sintesi dell'analogo con Lys in posizione 2

Fmoc-Aib-Lys(Z)-Leu-Aib-Gly-Gly-Leu-Aib-Gly-Ile-Leu-OMe

Sblocco del terz-butil-estere Fmoc-Aib-Lys(Z)-Leu-Aib-OtBu

0.79 mL di TFA (10 eq.) vengono aggiunti goccia a goccia ad una soluzione, in bagno a ghiaccio, di 0.90g di peptide (1 eq.) sciolti in CH₂Cl₂ (volume solvente uguale a quello del TFA da aggiungere). Si lascia reagire per un'ora, controllandone il decorso con TLC. Tirando a secco si ottiene un olio; dopo diversi lavaggi con Et₂O il TFA evapora completamente lasciando un solido che si filtra su gooch. Resa: 77%. Procedo utilizzando 0.50g (1 eq.) di Fmoc-Aib-Lys(Z)-Leu-Aib-OH

Sblocco di Z-Aib-Gly-Leu-Aib-Gly-Ile-Leu-OMe

Si sciolgono 0.48g (1 eq.) di peptide in MeOH, si disarea con N₂ e si introduce il 10% m/m di Pd/C (0.05 g). Si lascia reagire per circa 30' sotto flusso di H₂, seguendo la reazione con TLC. A fine reazione si filtra via il catalizzatore su celite. Il tutto viene tirato a secco.

Coupling:

Alla soluzione di Fmoc-Aib-Lys(Z)-Leu-Aib-OH e HOAt (0.103g, 1.1eq.) in CH₂Cl₂ anidro raffreddata a 0°C si aggiungono 0.145g (1.1eq.) di EDC, poi si unisce all'H-Aib-Gly-Leu-Aib-Gly-Ile-Leu-OMe ottenuto dallo sblocco precedente e 0.83mL (1 eq.) di NMM. Si controlla che il pH rimanga 8.0 e si lascia la miscela di reazione sotto agitazione a T°_{AMB} per un paio di giorni. Viene evaporato il solvente, si riprende con AcOEt e si lava con una soluzione di KHSO₄ al 5%, poi con H₂O, poi NaHCO₃ al 5% ed infine con H₂O. Si anidrifica, si filtra e tirato a secco. Purificazione con cromatografia flash in eluente AcOEt:EtOH 8:1.

Resa : 61%

Punto di fusione : 118 – 121 °C

Rf₂ : 0.95 **Rf₃** : 0.05 **Rf₄** : 0.31

IR (KBr): 3325, 1658, 1533 cm⁻¹

$[\alpha]_D^{20}$: -10.0° (c=0.2, MeOH)

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 8.12 [t, 1H, Gly NH], 7.79-7.28 [m, 21H, 8H NH, 8H Fmoc, 5H Z CH], 6.58 [s, 1H, NH], 5.92 [s, 1H, NH], 5.22 [t, 1H, NH], 5.09 [m, 4H, CH₂ uretanici di Z e Fmoc sovrapposti], 4.55 [m, 2H, α-CH], 4.42 [m, 2H, α-CH], 4.26 [m, 1H, α-CH], 3.97 [m, 6H, α-CH], 3.72 [m, 3H, OMe CH₃], 3.21 [m, 2H, Lys ε-CH₂], 2.17-1.60 [mm, 12H, 2H Leu β-CH₂, 1H Leu γ-CH, 1H Ile β-CH, 2H Ile γ-CH₂, 2H Lys β-CH₂, 2H Lys γ-CH₂, 2H Lys δ-CH₂], 1.45 [m, 18H, Aib β-CH₃], 0.91 [m, 21H, 3H Ile γ-CH₃, 18H Leu δ-CH₃].

n-Oct-Aib-Lys(Z)-Leu-Aib-Gly-Gly-Leu-Aib-Gly-Ile-Leu-OMe

Sblocco di Fmoc-Aib-Lys(Z)-Leu-Aib-Gly-Gly-Leu-Aib-Gly-Ile-Leu-OMe

Si sciolgono 422 mg (1 eq.) di peptide in CH₂Cl₂ anidro e quindi si aggiungono 0.63 mL di DEA (20 eq.). Si segue lo sblocco con TLC (AcOEt:EtOH 8:1). A sblocco terminato si evapora la DEA in evaporatore rotante e si fanno da due lavaggi con Et₂O. Si esegue una cromatografia flash con solo CH₂Cl₂ in partenza, cui viene fatto seguire un gradiente fino a CH₂Cl₂:EtOH 8:1.

Coupling:

Alla soluzione di n-OctOH (0.053 mL, 1.1 eq.) e HOAt (45mg, 1.1eq.) in CH₂Cl₂ anidro raffreddata a 0°C si aggiungono 64mg (1.1eq.) di EDC, poi si unisce all'H-Aib-Lys(Z)-Leu-Aib-Gly-Gly-Leu-Aib-Gly-Ile-Leu-OMe ottenuto dallo sblocco precedente e 0.034mL (1 eq.) di NMM. Si controlla che il pH rimanga 8.0 e si lascia la miscela di reazione sotto agitazione a T°_{AMB} per un paio di giorni. Viene evaporato il solvente, si riprende con AcOEt e si lava con una soluzione di KHSO₄ al 5%, poi con H₂O, poi NaHCO₃ al 5% ed infine con H₂O. Si anidrifica, si filtra e tirato a secco. Purificazione con cromatografia flash in eluente CH₂Cl₂:EtOH 10:1

Resa : 31%

Punto di fusione : 101 – 102 °C

Rf₂ : 0.91 **Rf₃** : 0.03 **Rf₄** : 0.13

IR (KBr): 3321, 1657, 1537 cm⁻¹

$[\alpha]_D^{20}$: -18.0 (c=0.2, MeOH)

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 8.09 [t, 1H, Gly⁶-NH], 7.95 [t, 1H, Gly⁵-NH], 7.70 [d, 1H, Leu³-NH], 7.65-7.64 [m, 3H, Aib⁸-NH, Gly⁹-HN e Ile¹⁰-HN], 7.54 [d, 1H, Leu⁷-NH], 7.52 [s, 1H, Aib⁴-NH], 7.32-34 [m, 7H, Aib¹-NH, Lys²-NH e Z-Ph], 7.25 [d, 1H, Leu¹¹-NH], 5.55 [t, 1H, Lys²-εNH], 5.08 [s, 2H, Z-CH₂], 4.53 [m, 1H], 4.30 [m, 1H], 4.09 [m, 1H], 3.99-3.76 [m, 5H], 3.7 [s, 3H, OMe CH₃], 3.69 [m, 3H], 3.15 [m, 2H, Lys⁹ ε-CH₂], 2.28 [m, 2H, nOct CH₂], 2.05 [m, 1H], 1.80-1.65 [m, 16H], 1.53-1.51 [m, 13H], 1.47 [s, 3H], 1.30-1.25 [m, 11H], 0.97-0.94 [m, 9H], 0.93-0.89 [m, 17H].

n-Oct-Aib-Lys(HCl)-Leu-Aib-Gly-Gly-Leu-Aib-Gly-Ile-Leu-OMe

Sblocco dello Z

Si sciolgono 86mg (1 eq.) di peptide in MeOH a cui si aggiunge dell'HCl sciolto in etere (1.1 eq.), si disarea con N₂ e si introduce il 10% ^{m/m} di Pd/C. Si lascia reagire per circa 30' sotto flusso di H₂, seguendo la reazione con TLC. A fine reazione si filtra via il catalizzatore su celite. Il tutto viene tirato a secco.

Resa : 98%

Punto di fusione : 148 – 150 °C

Rf₂ : 0.68 **Rf₃** : 0 **Rf₄** : 0

HPLC : Rt 11.93 min

IR (KBr): 3321, 1655, 1743, 1538 cm⁻¹

[α]_D²⁰ : -24.8 (c=0.2, MeOH)

¹H-NMR (400 MHz, H₂O/D₂O 9/1) : δ 8.37 [m, 2H, 2 NH], 8.31 [s, 1H NH], 8.08 [t, 1H, NH], 7.96 [m, 2H, 2 NH], 7.85 [s, 1H, 1 NH], 7.80-7.77 [m, 2H, 2 NH], 7.64-7.60 [m, 2H 2 NH], 7.48 [bs, 1H], 4.36 [m, 1H], 4.20-3.68 [m, 10H 10 α-CH], 3.64 [s, 3H, OMe CH₃], 3.11 [m, 2H, Lys² ε-CH₂], 2.23-2.11 [m, 2H, *n*Oct CH₂], 1.98-1.51 [m, 30H], 1.39, 1.37, 1.35, 1.33, 1.32, [5s, 18H, β-CH₃ Aib], 1.20-1.03 [m, 11H], 0.83-0.70 [m, 24H, δ-CH₃ Leu, δ-CH₃ e γ-CH₃ Ile], 0.69-0.65 [t, 2H, *n*Oct CH₃].

Spettrometria di Massa (ESI-TOF) : [M]⁺_{calc} = 1166.52; [M+H]⁺_{sper} = 1165.814

II.2.10 Sintesi dell'analogo con Lys in posizione 9***n-Oct-Aib-Gly-Leu-Aib-Gly-Gly-Leu-Aib-OtBu***

Sblocco di Z-Aib-Gly-Leu-Aib-Gly-Gly-Leu-Aib-OtBu

Si sciolgono 0.79g (1 eq.) di peptide in MeOH, si disarea con N₂ e si introduce il 10% ^{m/m} di Pd/C (0.08 g). Si lascia reagire per circa 30' sotto flusso di H₂, seguendo la reazione con TLC. A fine reazione si filtra via il catalizzatore su celite. Il tutto viene tirato a secco.

Coupling:

Alla soluzione di *n*-OctOH (0.172 mL, 1.1 eq.) e HOAt (0.15g, 1.1eq.) in CH₂Cl₂ anidro raffreddata a 0°C si aggiungono 0.21g (1.1eq.) di EDC, poi si unisce all'H-Aib-Gly-Leu-Aib-Gly-Gly-Leu-Aib-OtBu ottenuto dallo sblocco precedente e 0.12mL (1 eq.) di NMM. Si controlla che il pH rimanga 8.0 e si lascia la miscela di reazione sotto agitazione a T°_{AMB} per un paio di giorni. Viene evaporato il solvente, si riprende con AcOEt e si lava con una soluzione di KHSO₄ al 5%, poi con H₂O,

poi NaHCO_3 al 5% ed infine con H_2O . Si anidrifica, si filtra e tirato a secco. Purificazione con cromatografia flash in eluente $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}$ 20:1 gradiente fino 9:1.

Resa : 58%

Punto di fusione : 109 – 112 °C

Rf₂ : 0.88 **Rf₃** : 0.09 **Rf₄** : 0.33

IR (KBr): 3314, 1736, 1658, 1538 cm^{-1}

[α]_D²⁰ : -13.1° (c=0.5, MeOH)

¹H-NMR (400 MHz, CDCl_3): δ 8.34 [m, 1H, NH], 7.93 [t, 1H, NH], 7.83 [m, 2H, 1H NH, 1H NH], 7.64 [m, 1H, NH], 7.51 [s, 1H, Aib NH], 7.39 [d, 1H, Leu NH], 7.16 [s, 1H, Aib NH], 4.34 [t, 1H, α -CH], 4.16 [m, 1H, α -CH], 3.80 [m, 6H, 6 α -CH], 2.27 [m, 2H, Oct α -CH₂], 1.78 [m, 6H, 1H Leu γ -CH, 3H Leu β -CH₃, 2H Leu β -CH₂], 1.27 [m, 8H, Oct CH₂], 0.91 [m, 6H, Leu δ -CH₃].

n-Oct-Aib-Gly-Leu-Aib-Gly-Gly-Leu-Aib-Lys(Z)-Ile-Leu-OMe

Sblocco del terz-butil-estere Oct-Aib-Gly-Leu-Aib-Gly-Gly-Leu-Aib-OtBu

0.36 mL di TFA (10 eq.) vengono aggiunti goccia a goccia ad una soluzione, in bagno a ghiaccio, di 0.417g di peptide (1 eq.) sciolti in CH_2Cl_2 (volume solvente uguale a quello del TFA da aggiungere). Si lascia reagire per un'ora, controllandone il decorso con TLC. Tirando a secco si ottiene un olio; dopo diversi lavaggi con Et_2O il TFA evapora completamente lasciando un solido che si filtra su gooch. Resa: 60%. Proseguo utilizzando 222mg (1 eq.)

Sblocco di Fmoc-Lys(Z)-Ile-Leu-OMe

Si sciolgono 228 mg (1.1 eq.) di peptide in CH_2Cl_2 anidro e quindi si aggiungono 0.64 mL di DEA (20 eq.). Si segue lo sblocco con TLC ($\text{AcOEt}:\text{EP}$ 1:1). A sblocco terminato si evapora la DEA in evaporatore rotante e si fanno da due lavaggi con Et_2O . Si esegue una cromatografia flash con solo CH_2Cl_2 in partenza, cui viene fatto seguire un gradiente fino a $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{EtOH}$ 15:1.

Coupling:

Alla soluzione di Oct-Aib-Gly-Leu-Aib-Gly-Gly-Leu-Aib-OH e HOAt (41mg, 1.1eq.) in CH_2Cl_2 anidro raffreddata a 0°C si aggiungono 59mg (1.1eq.) di EDC, poi si unisce all'H-Lys(Z)-Ile-Leu-OMe ottenuto dallo sblocco precedente e 0.03mL (1 eq.) di NMM. Si controlla che il pH rimanga 8.0 e si lascia la miscela di reazione sotto agitazione a T°_{AMB} per un paio di giorni. Viene evaporato il solvente,

si riprende con AcOEt e si lava con una soluzione di KHSO_4 al 5%, poi con H_2O , poi NaHCO_3 al 5% ed infine con H_2O . Si anidrifica, si filtra e tirato a secco. Purificazione con cromatografia flash in eluente AcOEt:EP 7:1. Data la presenza di una impurezza si è dovuto eseguire una seconda colonna cromatografica per purificare il prodotto, con conseguente perdita di resa.

Resa : 23%

Punto di fusione : 95 – 97 °C

Rf₂ : 0.91 **Rf₃** : 0.07 **Rf₄** : 0.13

IR (KBr): 3327, 1658, 1538 cm^{-1}

[α]_D²⁰ : -10.9° (c=0.2, MeOH)

¹H-NMR (400 MHz, CDCl_3): δ 8.62 [t, 1H, Gly²-NH], 8.00 [t, 1H, Gly⁶-NH], 7.90 [t, 1H, Gly⁵-NH], 8.87 [s, 1H, Aib¹-NH], 7.79 [d, 1H, Leu³-NH], 7.68 [s, 1H, Aib⁸-NH], 7.67 [d, 1H, Leu⁷-NH], 7.66 [d, 1H, Ile¹⁰-NH], 7.54 [d, 1H, Leu¹¹-NH], 7.53 [s, 1H, Aib⁴-NH], 7.31-7.30 [m, 5H, Z-Ph], 7.03 [d, 1H, Lys⁹ NH], 5.68 [t, 1H, Lys⁹ ϵ -NH], 5.07-5.04 [m, 2H, Z-CH₂], 4.52 [m, 1H, Leu¹¹ α -CH], 4.24 [m, 1H, Ile¹⁰ α -CH], 4.17 [m, 1H, Leu³ α -CH], 4.07-4.05 [m, 2H, Leu⁷ α -CH e Lys⁹ α -CH], 3.86 [m, 2H, Gly² 1 α -CH e Gly⁶ 1 α -CH], 3.74 [m, 1H, Gly⁶ 1 α -CH], 3.7 [s, 3H, OMe CH₃], 3.69 [m, 1H Gly⁵ 1 α -CH], 3.68 [m, 1H Gly² 1 α -CH], 3.58 [m, 1H, Gly⁵ 1 α -CH], 3.17 [m, 2H, Lys⁹ ϵ -CH₂], 2.28 [m, 2H, *n*Oct CH₂], 2.05 [m, 1H, Ile¹⁰ β -CH], 1.89 [m, 2H, Lys⁹ β -CH₂], 1.80-1.75 [m, 3H, Leu³ 1 β -CH, Leu⁷ 1 β -CH e Leu¹¹ 1 β -CH], 1.70-1.62 [m, 11H, Leu³ γ - e β -CH, Leu⁷, Lys⁹ δ -CH₂, γ - e β -CH, Leu¹¹ γ -e β -CH, Ile¹⁰ 1 γ -CH e *n*Oct β -CH₂], 1.55 [s, 7H, Lys⁹ γ -CH e Aib⁴ β -CH₃], 1.53 [s, 6H, Aib⁸ 2 β -CH₃], 1.45 [s, 7H, Aib¹ 2 β -CH₃ e Lys⁹ 1 γ -CH], 1.34-1.30 [m, 11H, Ile¹⁰ 1 γ -CH e *n*Oct (CH₂)₅], 0.97-0.93 [m, 9H, Leu³ 2 δ -CH₃, Ile¹⁰ γ -CH₃], 0.92-0.86 [m, 17H, Leu⁷ 2 δ -CH₃, Ile¹⁰ δ -CH₃ e Leu¹¹ 2 δ -CH₃ e *n*Oct CH₃].

n-Oct-Aib-Gly-Leu-Aib-Gly-Gly-Leu-Aib-Lys(HCl)-Ile-Leu-OMe

Sblocco dello Z

Si sciolgono 45.4mg (1 eq.) di peptide in MeOH a cui si aggiunge dell'HCl sciolto in etere (1.1 eq.), si disarea con N_2 e si introduce il 10% m/m di Pd/C. Si lascia reagire per circa 30' sotto flusso di H_2 , seguendo la reazione con TLC. A fine reazione si filtra via il catalizzatore su celite. Il tutto viene tirato a secco.

Resa : 100%

Punto di fusione : 152 – 153 °C

Rf₂ : 0.68 **Rf₃** : 0 **Rf₄** : 0

HPLC : R_t 15.20 min

IR (KBr): 3317, 1743, 1657, 1537 cm^{-1}

$[\alpha]_D^{20}$: -14.6° (c=0.2, MeOH)

¹H-NMR (400 MHz, H₂O/D₂O 9/1): δ 8.66 [t, 1H, Gly² NH], 8.43 [t, 1H, Gly⁵-NH], 8.35 [s, 1H, Aib¹-NH], 8.08 [t, 1H, Gly⁶-NH], 8.04 [d, 1H, Leu³-NH], 7.85 [d, 1H, Leu⁷-NH], 7.84 [s, 1H, Aib⁸-NH], 7.82 [s, 1H, Aib⁴-NH], 7.60-7.59 [d, 1H, Ile¹⁰ NH], 7.55 [d, 1H, Leu¹¹-NH], 7.37 [d, 1H, Lys⁹ NH], 4.36 [m, 1H, Leu¹¹ α -CH], 4.20 [m, 1H, Leu³ α -CH], 4.13-4.12 [m, 2H, Ile¹⁰ α -CH e Lys⁹ α -CH], 4.04 [m, 1H, Leu⁷ α -CH], 3.96 [m, 1H, Gly⁶ 1 α -CH], 3.92 [m, 1H], 3.89 [m, 1H, Gly² 1 α -CH], 3.84 [m, 1H, Gly⁵ 1 α -CH], 3.76-3.71 [m, 3H, Gly⁵ α -CH, Gly⁶ α -CH e Gly² α -CH], 3.65 [s, 3H, OMe CH₃], 2.92 [m, 2H, Lys⁹ ϵ -CH₂], 2.17 [m, 2H, *n*Oct CH₂], 1.85 [m, 1H, Ile¹⁰ β -CH], 1.74 [m, 2H, Lys⁹ β -CH₂], 1.68 [m, 2H, Leu³ β -CH₂], 1.61 [m, 2H, Leu¹¹ β -CH₂], 1.55 [m, 1H, Leu³ 1 γ -CH], 1.44 [m, 2H, *n*Oct β -CH₂], 1.42 [s, 8H, Lys⁹ γ -CH₂, Ile¹⁰ 1 γ -CH e Aib⁴ β -CH₃], 1.36 [s, 6H, Aib¹ 2 β -CH₃], 1.35 e 1.32 [2s, 6H, 2 Aib⁸ β -CH₃], 1.20-1.04 [m, 11H, Ile¹⁰ 1 γ -CH e *n*Oct (CH₂)₅], 0.83-0.79 [m, 9H, Leu³ 2 δ -CH₃, Ile¹⁰ γ -CH₃], 0.76-0.72 [m, 15H, Leu⁷ 2 δ -CH₃, Ile¹⁰ δ -CH₃ e Leu¹¹ 2 δ -CH₃], 0.67 [t, 2H, *n*Oct CH₃].

Spettrometria di Massa (ESI-TOF) : $[M]^+_{\text{calc}} = 1166.52$; $[M+H]^+_{\text{sper}} = 1165.825$

III Risultati e discussione:

III.1 Strategia di sintesi dei peptidi

Per sintetizzare gli analoghi della tricogina sono state impiegate le classiche procedure di sintesi in soluzione, combinando opportunamente l'approccio "*step-by-step*" alla condensazione di segmenti. I peptaibolici infatti, a causa della presenza di amminoacidi C^α-tetrasostituiti, hanno una reattività notevolmente più bassa nella formazione del legame ammidico rispetto agli amminoacidi proteici. Pertanto, la sintesi su fase solida, oggi largamente impiegata per la sintesi chimica dei peptidi, darebbe in questo caso prodotti non puri e in rese modeste.

Ulteriori vantaggi offerti dalla sintesi in soluzione sono: (i) l'ottenimento di prodotti ad elevata purezza ottica in quantità elevate e (ii) la possibilità di studiare, nel corso della sintesi, gli effetti dell'allungamento della catena peptidica sulla conformazione, poiché si possono isolare sequenze peptidiche intermedie.

La strategia sintetica migliore per minimizzare i rischi di racemizzazione prevede di partire dal residuo C-terminale e aggiungere un amminoacido alla volta, protetto al gruppo amminico da una funzione uretanica ("*step-by-step approach*"). Tuttavia, con peptidi relativamente lunghi (> 10 residui) i tempi richiesti per questo tipo di approccio sintetico si allungano notevolmente soprattutto se, come in questo caso, non si ricorre alla sintesi su fase solida.

Un'alternativa valida è rappresentata dalla sintesi per segmenti ("*fragment condensation approach*"), i cui vantaggi rispetto allo "*step-by-step approach*" sono essenzialmente due: (i) tempi di sintesi ridotti, grazie tra l'altro alla possibilità di procedere in parallelo nella preparazione dei segmenti peptidici richiesti, e (ii) isolamento più facile dei prodotti in quanto differiscono significativamente nei pesi molecolari, e quindi nelle proprietà chimico-fisiche, dai reagenti. Di contro tale procedura presenta non trascurabili rischi di racemizzazione (o epimerizzazione) all'atto della giunzione dei segmenti. Nella fase di attivazione della funzione carbossilica può essere persa la purezza ottica del residuo C-terminale, ma talvolta anche quella del penultimo residuo. È questo in particolare il caso che si verifica quando il meccanismo di *coupling* comporta la formazione di un ossazolone, come di norma accade quando l'amminoacido attivato è un residuo di Aib. L'effetto *gem*-dialchile, derivate dalla

doppia sostituzione in posizione α da parte dei gruppi metilici, favorisce la formazione dell'ossazolone: l'eterociclo così formato mette a repentaglio la purezza ottica dell'amminoacido che precede l'Aib come illustrato in Illustrazione 10.

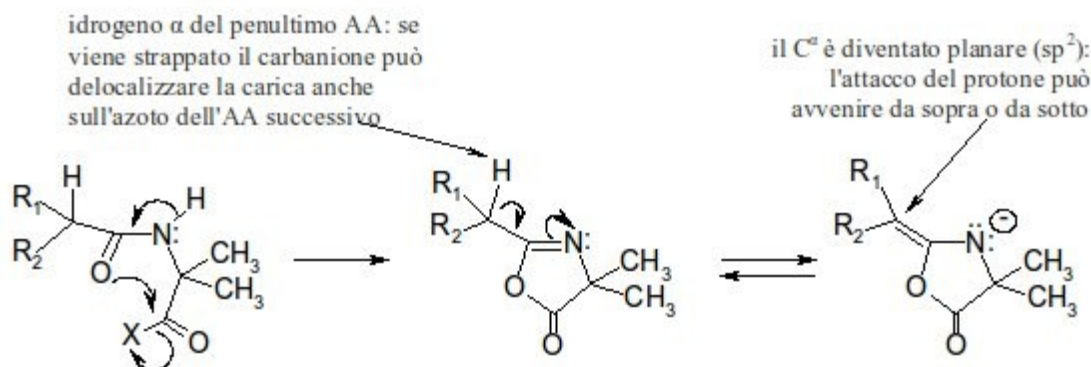


Illustrazione 10: Meccanismo di racemizzazione via ossazolone del penultimo amminoacido nella condensazione di segmenti.

La strategia sintetica adottata in questa Tesi risulta essere una combinazione dei due metodi, poiché lo schema di sintesi progettato per gli analoghi prevede la condensazione di tre segmenti, precedentemente sintetizzati “*step-by-step*”.

Nel delineare la strategia più opportuna si è tenuto conto del fatto che *coupling* che prevedono la partecipazione del gruppo amminico dell'Aib avvengono con difficoltà. Inoltre sono state individuate le due posizioni opportune dove sostituire le glicine con le lisine, e precisamente la 2 e la 9. Infatti, nell'ipotesi (molto probabile) che il peptide mantenga una conformazione elicoidale, le posizioni 2 e 9 si trovano posizionate sulla faccia idrofila (o meno idrofobica) dell'elica. La presenza dell'ammina in catena laterale della lys impone limitazioni nella scelta dei gruppi protettori: nelle condizioni di rimozione del protettore dai gruppi α -amminici non deve infatti essere rimosso il gruppo protettore in catena laterale della lys.

Per portare a termine la sintesi dei due analoghi della tricogina previsti, sono stati individuati cinque segmenti principali (A, B, C, D, E) da sintetizzare *step-by-step*. Essi sono evidenziati nei due schemi di sintesi riportati qui di seguito:

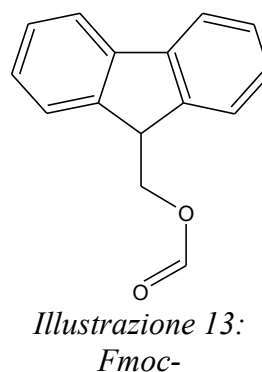
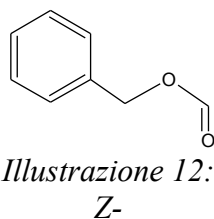
Segmento C				Segmento B				Segmento A		
Aib	Lys	Leu	Aib	Gly	Gly	Leu	Aib	Gly	Ile	Leu
		Z — OH	Z — OtBu			Z — OH	Z — OtBu		Z — OH	HCl·H — OMe
		Z — ii,iii	Z — OtBu			Z — ii,iii	Z — OtBu		Z — i	OMe
Fmoc — OH	Fmoc — Z			Z — OH	Z — iv, i			Z — OH	Z — iv, i	OMe
Fmoc — v, iii	Z			Z — iv, i				Z — iv, i		OMe
Fmoc —	Z							Z — vi, iv, iii		OMe
Fmoc —	Z									OMe
Oct —	H·HCl									OMe
										OMe

Segmento E				Segmento B				Segmento D		
Aib	Gly	Leu	Aib	Gly	Gly	Leu	Aib	Lys	Ile	Leu
		Z — OH	Z — OtBu			Z — OH	Z — OtBu		Z — OH	HCl·H — OMe
		Z — ii,iii	Z — OtBu			Z — ii,iii	Z — OtBu		Z — i	OMe
Z — OH	Z — iv, i			Z — OH	Z — iv, i			Z — OH	Z — iv, i	OMe
Z — iv, iii				Z — iv, i				Z — vi, v, iii, viii		OMe
								Fmoc — Z		OMe
								Fmoc — Z		OMe
Oct —								H·HCl		OMe
										OMe

Illustrazione 11: Strategia di sintesi adottata per ottenere i due undecapeptidi: (i): HOBt, EDC, NMM in CH₂Cl₂; (ii): H₂, Pd(10%)/C in CH₂Cl₂; (iii): HOAt, EDC, NMM in CH₂Cl₂; (iv): H₂, Pd(5%)/C in MeOH; (v): DEA in CH₂Cl₂; (vi): TFA in CH₂Cl₂; (vii): nOctOH, HOAt, EDC, NMM in CH₂Cl₂; (viii): H₂, Pd(5%)/C, HCl (1eq.) in MeOH

III.1.1 Gruppi protettori

Sono stati utilizzati come gruppi N^α-protettori il benzilossicarbonile (Z) e lo Fmoc, come indicato nelle illustrazioni 12 e 13.



Lo Z viene di frequente usato poichè: (i) gli Z-derivati hanno una buona stabilità chimica e fisica, (ii) i sottoprodotti volatili provenienti dalla sua idrogenolisi catalizzata

(toluene e anidride carbonica) sono facilmente eliminabili e (iii) presenta un cromoforo aromatico che aiuta notevolmente a seguire il decorso delle reazioni mediante TLC.

Nei segmenti in cui è presente la lys si è preferito proteggere l'ammina in catena laterale con lo Z e quella in posizione α lo Fmoc, che si rimuove in condizioni basiche blande, non interferendo quindi con gli altri gruppi protettori presenti.

Come gruppi C-protettori si sono scelti OtBu e OMe (Illustrazione 14 e 15)

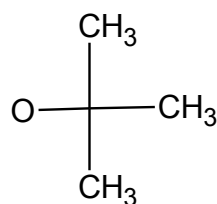


Illustrazione
14: -OtBu

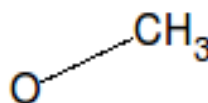


Illustrazione 15: -OMe

Il gruppo *terz*-butilico di preferenza è utilizzato perché aumenta la solubilità dei peptidi nei solventi organici ed è stabile nelle condizioni di rimozione dei gruppi Z e Fmoc. Inoltre può essere rimosso facilmente per acidolisi.

Riguardo la questione del leucinolo C-terminale, presente naturalmente nella tricogina GA IV, si è deciso di lasciare intatta la protezione OMe, in quanto si è visto in studi precedenti in questo Laboratorio che l'attività biologica rimane invariata [47].

III.1.2 Metodi di attivazione

Per quanto riguarda la scelta dei metodi di formazione dei legami ammidici è opportuno sottolineare che gli α -amminoacidi C $^{\alpha}$ -tetrasostituiti sono poco reattivi nella formazione del legame peptidico a causa dell'ingombro sterico sul C $^{\alpha}$. Tale influenza negativa si fa sentire maggiormente sul gruppo amminico che su quello carbossilico.

L'esperienza acquisita in questo Laboratorio nella sintesi di peptidi contenenti amminoacidi stericamente impediti ha suggerito di ricorrere, a motivo dell'efficacia e della praticità d'uso, al metodo di attivazione del gruppo carbossilico *via* EDC/HOAt [58] o EDC/HOBt (Illustrazione 16).

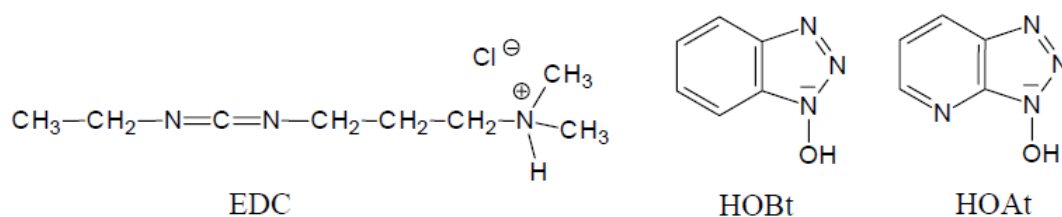


Illustrazione 16: Formule di struttura di EDC, HOBt e HOAt

Questi due additivi svolgono la duplice funzione di sopprimere la racemizzazione e di catalizzare la reazione di acilazione. Proprio per questa seconda caratteristica essi vengono comunemente utilizzati anche con gli α -amminoacidi C^α -tetrasostituiti, i quali, essendo privi dell'atomo di idrogeno sul C^α , non possono racemizzare.

Nella procedura di attivazione *via* EDC/HOAt la carbodiimmide promuove la formazione di un intermedio estere attivo tra il gruppo carbossilico dell'amminoacido N^α -protetto e l'HOAt [58]. L'effetto catalitico di tale estere si esplica mediante l'assistenza che gli atomi di azoto, in posizione 2 e 7, forniscono all'attacco nucleofilo del gruppo amminico. Da studi recenti è emerso che la conformazione preferita allo stato cristallino dagli -OAt esteri prevede la perpendicolarità del piano dell'-OAt rispetto a quello del gruppo carbossilico [59]. Se tale disposizione tridimensionale si conserva in soluzione, il gruppo amminico reagente con l'estere trova assistenza su entrambe le facce da parte dell'atomo di azoto in posizione 2 o 7 dell'-OAt (Illustrazione 17). Questo meccanismo spiega anche il minor effetto catalitico esercitato dall'HOBt, che può fornire assistenza con un atomo di azoto su una sola faccia.

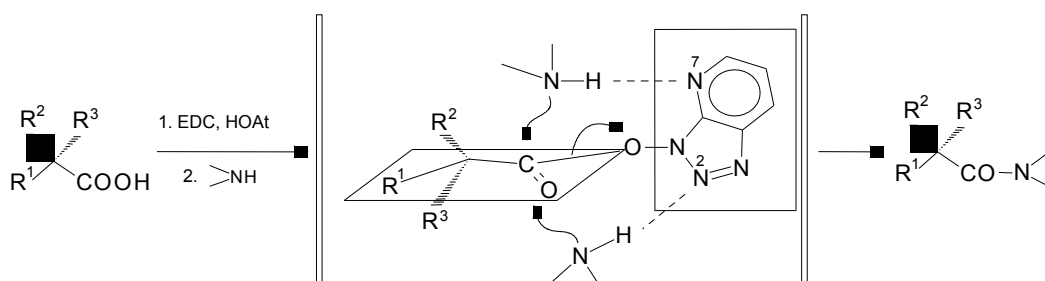


Illustrazione 17: Attacco nucleofilo assistito nella formazione del legame ammidico via attivazione del gruppo carbossilico con HOAt.

III.1.3 Metodiche di caratterizzazione

Tutti i composti isolabili sono stati caratterizzati mediante determinazione del punto di fusione (se solidi), del comportamento cromatografico (TLC in diversi sistemi eluenti), del potere ottico rotatorio specifico, dell'assorbimento IR allo stato solido e con la spettrometria $^1\text{H-NMR}$. Come ulteriore caratterizzazione, per alcuni peptidi si è ricorsi all'analisi HPLC e sono stati anche registrati gli spettri di massa.

III.2 Indagini conformazionali

Le preferenze conformazionali in soluzione dei peptidi sintetizzati sono state indagate in soluzione mediante assorbimento IR e spettrometria NMR.

III.2.1 Assorbimento IR

I segmenti peptidici più lunghi e i due analoghi finali della tricogina con la Lys protetta sono stati sottoposti a studi di assorbimento IR in soluzione per indagarne le preferenze conformazionali. Tali indagini permettono di valutare l'entità dei legami a idrogeno tra gli NH e i C=O ammidici dei peptidi e di fare ragionevoli ipotesi sulla loro natura *inter-* o *intra*-molecolare.

Si è ritenuto opportuno focalizzare l'indagine sui peptidi:

- **C**: Fmoc-Aib-Lys(Z)-Leu-Aib-OtBu;
- **D**: Fmoc-Lys-Ile-Leu-OMe;
- **E**: Z-Aib-Gly-Leu-Aib-OtBu;
- **BA**: Z-Gly-Gly-Leu-Aib-Gly-Ile-Leu-OMe;
- **Oct-EB**: Oct-Aib-Gly-Leu-Aib-Gly-Gly-Leu-Aib-OtBu;
- **Oct-K²(Z)**: Oct-Aib-Lys(Z)-Leu-Aib-Gly-Gly-Leu-Aib-Gly-Ile-Leu-OMe
- **Oct-K⁹(Z)**: Oct-Aib-Gly-Leu-Aib-Gly-Gly-Leu-Aib-Lys(Z)-Ile-Leu-OMe

Lo studio è stato effettuato in deuterocloroformio (solvente di bassa polarità) negli intervalli di frequenza più ricchi di informazioni [60]:

- 3600-3200 cm^{-1} , corrispondente alle vibrazioni di stiramento dei legami N-H dei gruppi uretanici e peptidici;
- 1800-1600 cm^{-1} , corrispondente alle vibrazioni di stiramento dei legami C=O esterei, uretanici e peptidici.

Per tutti i peptidi esaminati l'indagine di assorbimento IR è stata effettuata alla concentrazione 1×10^{-3} M e si è indagato l'effetto della diluizione tra 1×10^{-3} e 1×10^{-4} M. I risultati sono riportati nelle Tabelle 3 e 4 e nelle Illustrazioni 18-23.

Peptide	3600-3200 cm^{-1}	1800-1600 cm^{-1}
C	<u>3452</u> , <u>3426^a</u> , <u>3384^a</u> , <u>3342^b</u>	<u>1714^b</u> , <u>1672</u> , <u>1662^a</u> , <u>1610</u> , <u>1588</u>
D	<u>3430</u> , <u>3450^a</u>	<u>1742</u> , <u>1710</u> , <u>1668^b</u>
E	<u>3474^a</u> , <u>3446</u> , <u>3422^a</u> , <u>3390</u> , <u>3340^b</u>	<u>1730^a</u> , <u>1712</u> , <u>1680</u> , <u>1666^a</u> , <u>1612</u> , <u>1588</u> , <u>1538</u>
BA	<u>3356^a</u> , <u>3428</u> , <u>3392^a</u> , <u>3318^b</u>	<u>1734^a</u> , <u>1708^a</u> , <u>1676^b</u> , <u>1644^a</u> , <u>1610</u> , <u>1558</u> , <u>1538^a</u>
Oct-EB	<u>3476a</u> , <u>3452a</u> , <u>3424a</u> , <u>3390^a</u> , <u>3334^a</u> , <u>3316^b</u> , <u>3300^a</u>	<u>1728^a</u> , <u>1710</u> , <u>1682^a</u> , <u>1658^b</u> , <u>1632^a</u> , <u>1602</u>
Oct-K ⁹ (Z)	<u>3452</u> , <u>3422</u> , <u>3376^a</u> , <u>3558^a</u> , <u>3324^b</u>	<u>1738</u> , <u>1710</u> , <u>1682</u> , <u>1656</u> , <u>1636^a</u> , <u>1608</u> , <u>1588</u>
Oct-K ² (Z)	<u>3448</u> , <u>3420^a</u> , <u>3370^a</u> , <u>3330^b</u> , <u>3318^a</u>	<u>1740</u> , <u>1708</u> , <u>1654^b</u> , <u>1604</u> , <u>1584</u> , <u>1538</u>

Tabella 3: Frequenze di assorbimento IR dei peptidi **C**, **D**, **E**, **BA**, **Oct-EB**, **Oct-K²(Z)** e **Oct-K⁹(Z)** in CDCl_3 alla concentrazione di 1×10^{-3} M.

NOTA: ^aspalla, ^bbanda larga. I valori sottolineati si riferiscono a bande deboli (.....) intense (____) o molto intense (___)

Peptide	1800-1600 cm^{-1}
C	<u>3452</u> , <u>3426^a</u> , <u>3388^a</u> , <u>3342</u>
D	<u>3450^a</u> , <u>3432</u>
E	<u>3374^a</u> , <u>3346</u> , <u>3422^a</u> , <u>3390^a</u> , <u>3342^b</u>
BA	<u>3456^a</u> , <u>3428</u> , <u>3392^a</u> , <u>3322^b</u>
Oct-EB	<u>3474</u> , <u>3452^a</u> , <u>3424</u> , <u>3390^a</u> , <u>3308^b</u>
Oct-K ⁹ (Z)	<u>3476^a</u> , <u>3452</u> , <u>3422</u> , <u>3376^a</u> , <u>3322^b</u>
Oct-K ² (Z)	<u>3448</u> , <u>3418</u> , <u>3374^a</u> , <u>3334^b</u> , <u>3308^a</u>

Tabella 4: Frequenze di assorbimento IR dei peptidi **C**, **D**, **E**, **BA**, **Oct-EB**, **Oct-K²(Z)** e **Oct-K⁹(Z)** in CDCl_3 alla concentrazione di 1×10^{-3} M

NOTA: ^aspalla, ^bbanda larga. I valori sottolineati si riferiscono a bande deboli (.....) intense (____) o molto intense (___)

Le illustrazioni 18 e 19 mettono a confronto le curve di segmenti corti con i due analoghi della tricogina sintetizzati per poter valutare il contributo dell'allungamento della catena sulla struttura.

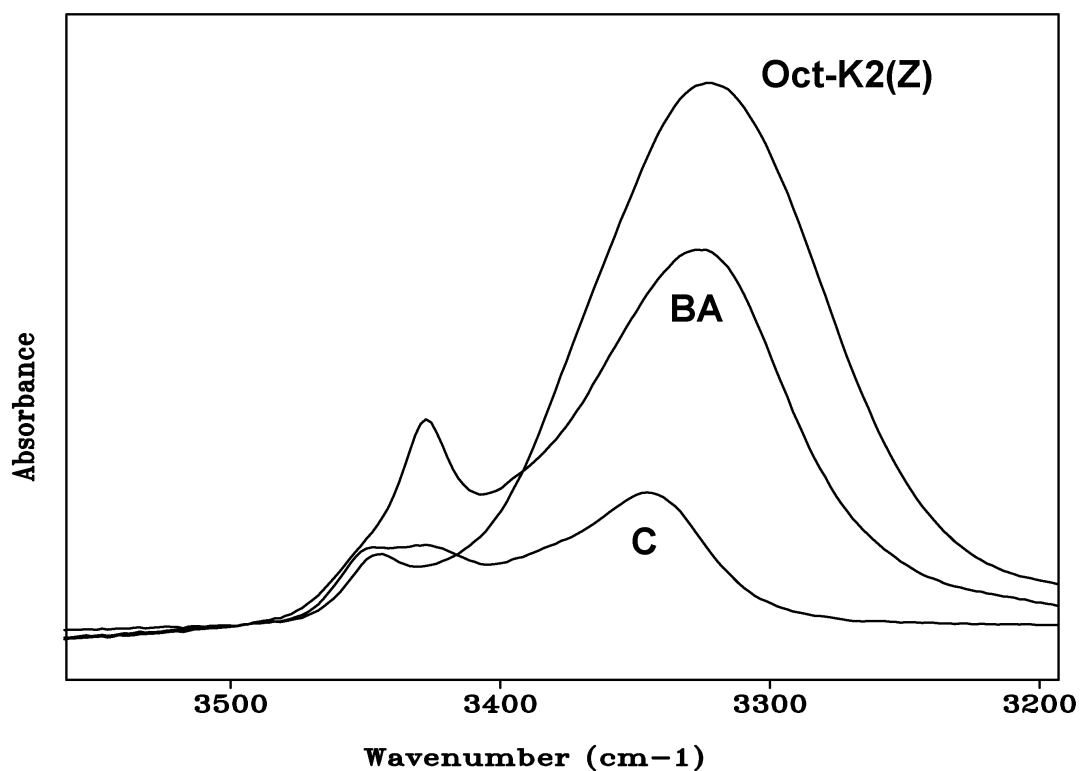


Illustrazione 18: Spettri di assorbimento IR dei peptidi **C**, **BA**, e **Oct-K²(Z)** nella zona di stiramento dei legami N-H, in CDCl_3 alla concentrazione di 1×10^{-3} M.

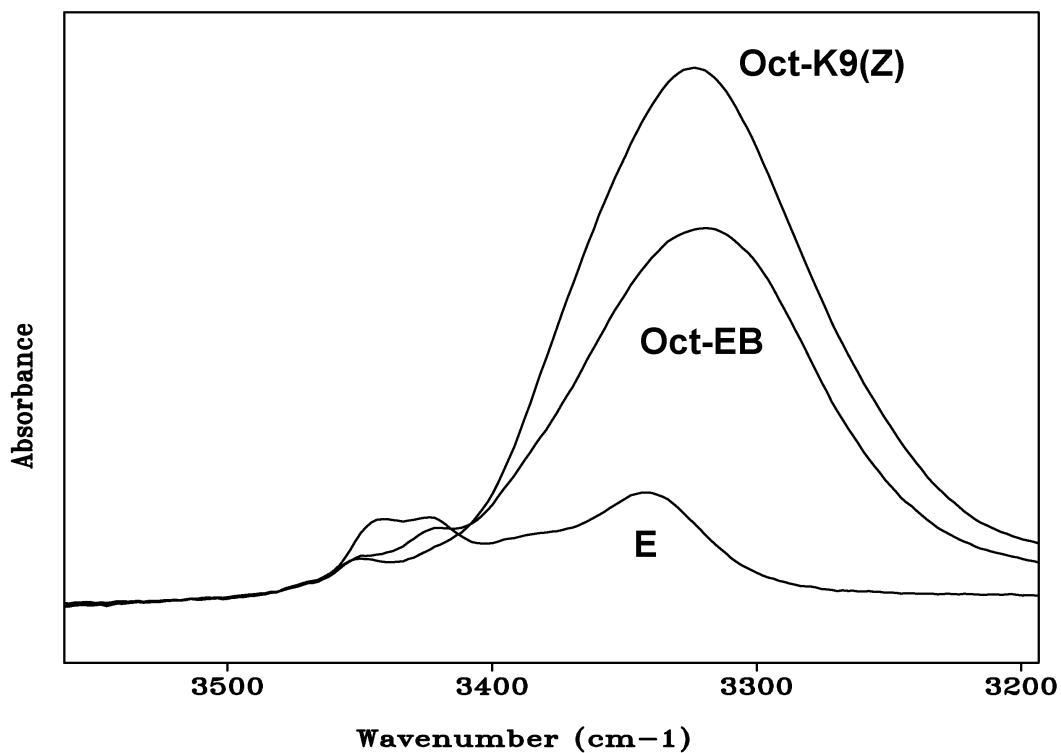
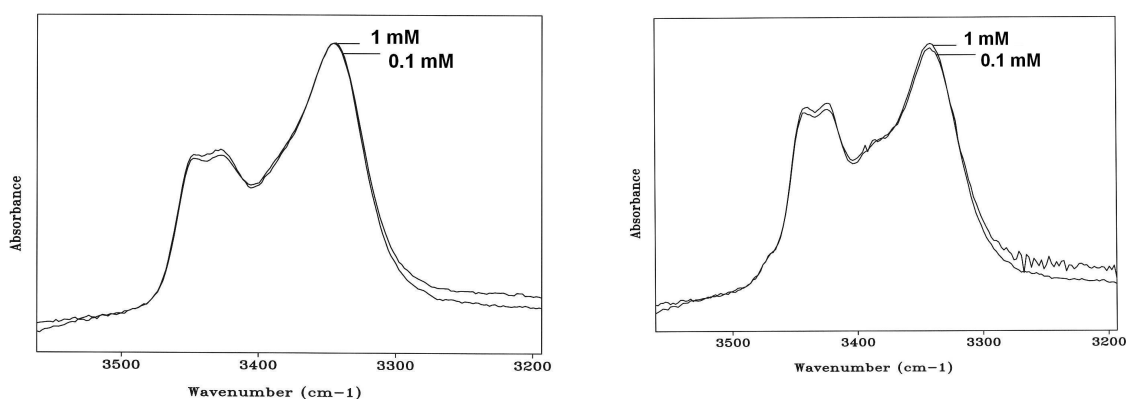
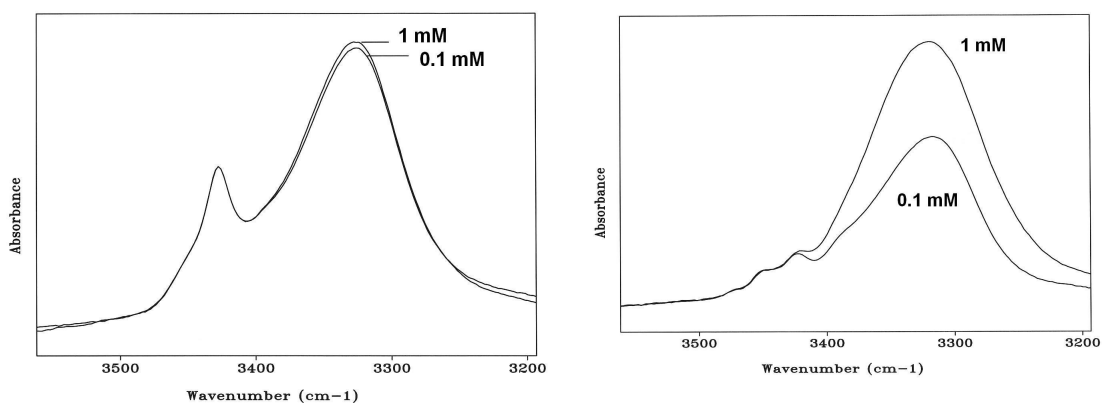


Illustrazione 19: Spettri di assorbimento IR dei peptidi **E**, **Oct-EB**, e **Oct-K⁹(Z)** nella zona di stiramento dei legami N-H, in CDCl_3 alla concentrazione di 1×10^{-3} M.

Di seguito (illustrazioni 20-23) sono mostrati gli spettri di ciascuno dei peptidi nella regione $3500\text{--}3200\text{ cm}^{-1}$ ottenuti alle concentrazioni 1×10^{-3} e 1×10^{-4} M. Tali spettri sono normalizzati in quanto per ogni decremento di concentrazione di un fattore 10 si è utilizzata una cella di cammino ottico 10 volte maggiore (1.0 mm per 1×10^{-3} M e 10.0 mm per 1×10^{-4} M).



*Illustrazione 20: Spettri di assorbimento IR dei tetrapeptidi **C** (a sinistra) ed **E** (a destra) nella regione $3500\text{--}3200\text{ cm}^{-1}$ in CDCl_3 alle concentrazioni 1×10^{-3} M e 1×10^{-4} M.*



*Illustrazione 21: Spettri di assorbimento IR dei peptidi **BA** (a sinistra) ed **Oct-EB** (a destra) nella regione $3500\text{--}3200\text{ cm}^{-1}$ in CDCl_3 alle concentrazioni 1×10^{-3} M e 1×10^{-4} M.*

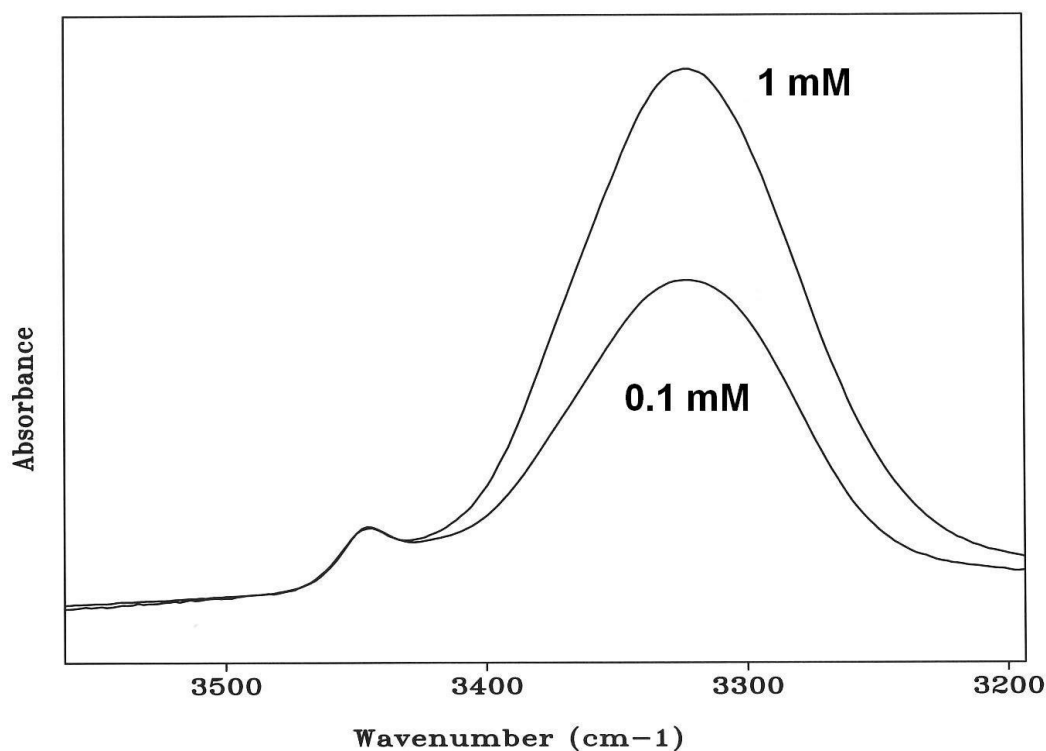


Illustrazione 22: Spettri di assorbimento IR dell'analogo della tricogina **Oct-K²(Z)** nella regione 3500-3200 cm⁻¹ in CDCl₃ alle concentrazioni 1×10^{-3} M e 1×10^{-4} M.

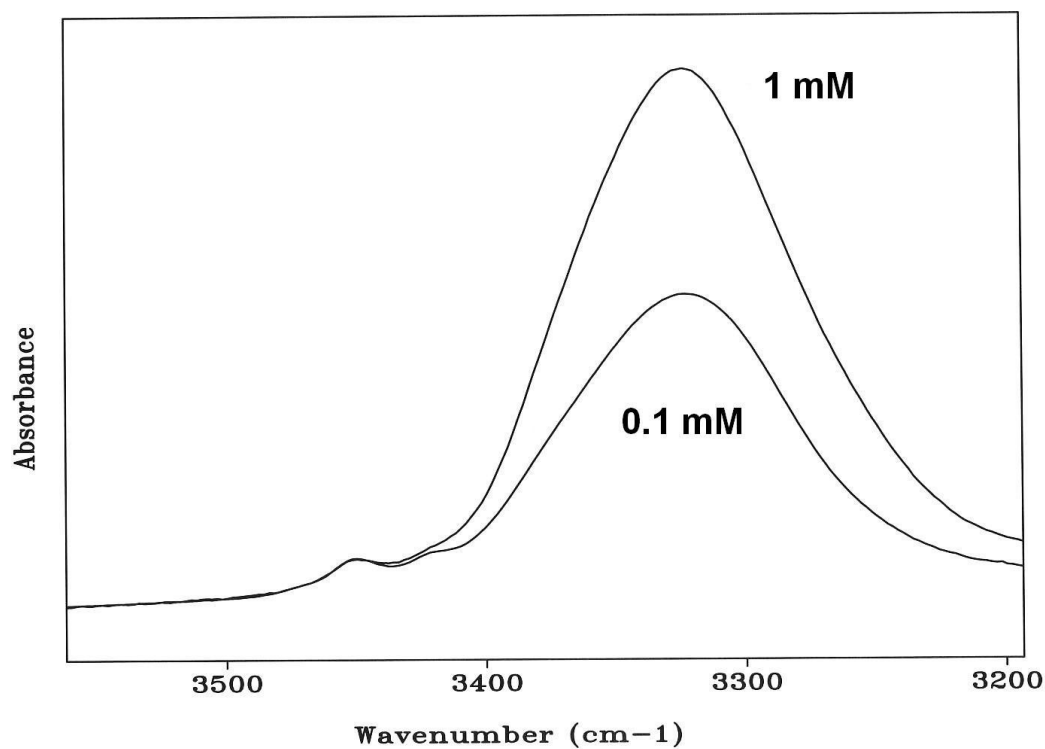


Illustrazione 23: Spettri di assorbimento IR dell'analogo della tricogina **Oct-K⁹(Z)** nella regione 3500-3200 cm⁻¹ in CDCl₃ alle concentrazioni 1×10^{-3} M e 1×10^{-4} M.

I risultati più interessanti derivanti dall'indagine di assorbimento IR si possono così riassumere:

- Nella regione spettrale 3500-3200 cm^{-1} tutti i peptidi esaminati mostrano bande di intensità variabile in due zone tipiche: a numeri d'onda superiori a 3400 cm^{-1} (vibrazioni di stiramento di gruppi N-H liberi e solvatati) e a frequenze inferiori a 3400 cm^{-1} (vibrazioni di stiramento di gruppi N-H impegnati in legami a idrogeno) [61].
- Lo studio degli effetti della diluizione porta a ritenere che i legami idrogeno osservati sugli N-H peptidici siano prevalentemente di tipo *intramolecolare* [61]. Infatti l'intensità delle bande fra 3340-3300 cm^{-1} non cambia affatto nei peptidi **C**, **E** e **BA** con la diluizione da 1×10^{-3} M a 1×10^{-4} M, mentre cala d'intensità, ma non scompare, nei peptidi più lunghi **Oct-EB**, **Oct-K²(Z)** e **Oct-K⁹(Z)**. Tale comportamento dei tre ultimi peptidi è indice di una spiccata propensione all'aggregazione, mediata da legami ad idrogeno *intermolecolari* tra N-H e C=O ammidici non impegnati in legami ad idrogeno *intramolecolari*.
- Nelle illustrazioni 18 e 19 si osserva che con l'elongazione della catena peptidica aumenta l'intensità della banda degli NH legati e il massimo di assorbimento si sposta a frequenze d'onda minori. Ciò significa che, a mano a mano che i segmenti diventano più lunghi, la catena peptidica si organizza in una struttura secondaria stabilizzata da legami a idrogeno *intramolecolari*.
- Per quanto riguarda la regione spettrale 1800-1600 cm^{-1} (Tabelle 3 e 4), nella zona 1710-1740 cm^{-1} cadono i picchi di assorbimento delle vibrazioni di stiramento dei gruppi C=O estere (*ter-t*butilico e metilico) e dei gruppi C=O uretanici [61]. I gruppi C=O peptidici e ammidici (banda ammidici I) risuonano nell'intervallo spettrale 1685 - 1659 cm^{-1} [61]. Negli spettri dei peptidi più lunghi il massimo di assorbimento della banda ammidici I è localizzato a 1658-1654 cm^{-1} . Tale massimo è prossimo alla posizione canonica della banda ammidici I delle strutture elicoidali di tipo α (1658 cm^{-1}) e 3_{10} (1662 cm^{-1}).

Riassumendo, i risultati dell'indagine di assorbimento IR in soluzione di CDCl_3 inducono ad ipotizzare che i peptidi esaminati assumano in prevalenza conformazioni ripiegate, quelli corti, o elicoidali, quelli lunghi, stabilizzate da legami ad idrogeno *intramolecolari*. Non è tuttavia possibile stabilire se si tratti di eliche- α , di eliche- 3_{10} , o di combinazioni delle due.

III.2.2 Spettroscopia ^1H -NMR degli analoghi contenenti Lys(Z)

La spettrometria ^1H -NMR è stata impiegata per condurre un'indagine conformazionale in diversi solventi sugli analoghi della tricogina sintetizzati. In questa Tesi vengono riportati studi preliminari riguardanti i due analoghi **Oct-K²(Z)** e **Oct-K⁹(Z)**, nello stesso solvente (CDCl_3) impiegato per gli studi di assorbimento IR. Ulteriori e più approfondite analisi, soprattutto in acqua per gli analoghi aventi la Lys deprotetta, sono ora in corso nel nostro Laboratorio.

Gli spettri ^1H -NMR mono e bidimensionali acquisiti per i due undcapeptidi **Oct-K²(Z)** e **Oct-K⁹(Z)** in CDCl_3 hanno evidenziato (i) la presenza di una struttura secondaria di tipo elicoidale e (ii) una elevata tendenza all'aggregazione, confermando quanto già osservato tramite gli studi di assorbimento IR. A tali conclusioni si è giunti analizzando gli spettri ROESY, che con quelli COSY hanno consentito anche l'assegnazione di tutte le risonanze protoniche, e osservando il comportamento dei protoni ammidici all'aggiunta di percentuali crescenti di DMSO alle soluzioni peptidiche in CDCl_3 (1 mM). Il DMSO, forte accettore di legami ad idrogeno [62a], solvata gli NH ammidici non impegnati in legami ad H e li sposta a ppm maggiori. I risultati di questi esperimenti con il DMSO sono riportati nell'illustrazione 24.

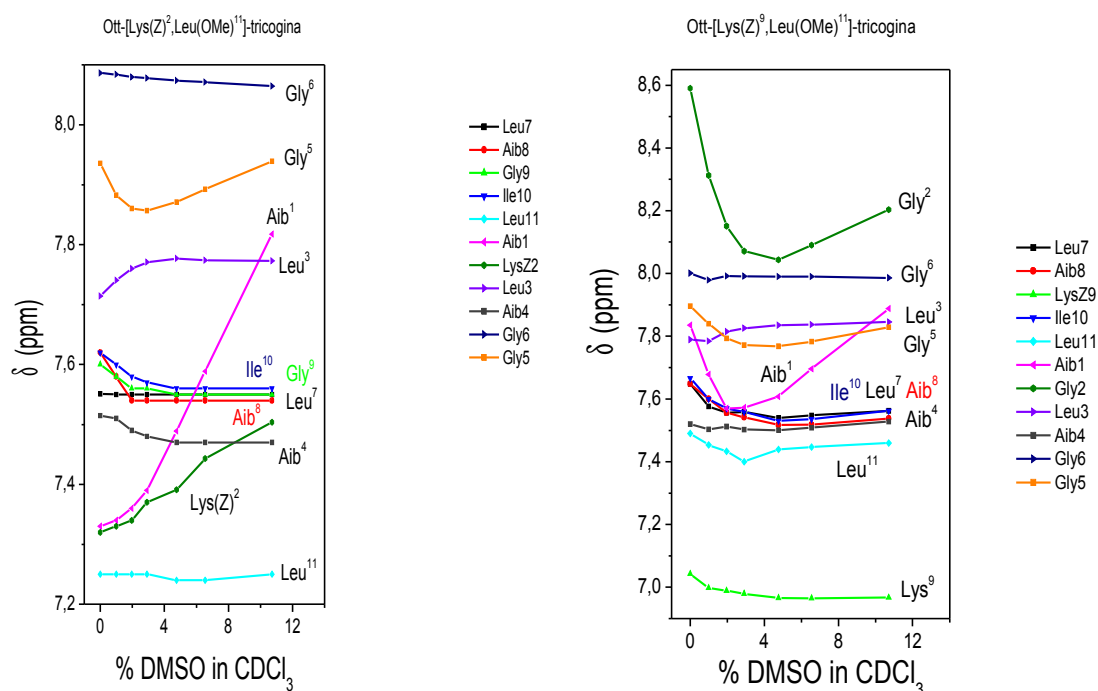


Illustrazione 24: Variazione degli spostamenti chimici (in ppm) dei protoni NH di **Oct-K²(Z)** (a sinistra) e di **Oct-K⁹(Z)** (a destra) in CDCl₃ alla concentrazione 1 mM, in funzione dell'aggiunta di percentuali crescenti di DMSO (v/v).

Si può notare come la frequenza di risonanza della maggior parte dei protoni ammidici non sia influenzata in maniera drammatica dalle aggiunte dell'agente perturbante. Questo comportamento è consistente con la presenza di un esteso sistema di legami a idrogeno intramolecolare diagnostico di una struttura elicoidale. In aggiunta, nel caso del peptide **Oct-K²(Z)** solo i protoni ammidici dei primi due residui, Aib¹ e Lys², sembrano essere esposti al solvente e pertanto non impegnati in legami ad H. Tale comportamento avvalorava ulteriormente la conclusione che il peptide adotti una struttura elicoidale ed è anche consistente con l'ipotesi che, almeno nel suo tratto N-terminale, l'elica peptidica sia di tipo 3₁₀. In questo caso infatti i primi due NH N-terminali risultano non impegnati in legami ad H.

Il comportamento del peptide **Oct-K⁹(Z)** è leggermente diverso. L'iniziale spostamento a campi alti delle risonanze ammidiche dei primi due residui, Aib¹ e Gly², è indicativo della presenza di specie aggregate. Infatti, le prime aggiunte di DMSO (fino al 2%) perturbano la rete di legami ad H *intermolecolari* fino a disgregarla. Da quel punto in poi i *chemical shifts* dei due protoni ammidici N-terminali si muovono verso campi bassi, mentre quelli degli altri NH (legati *intramolecolarmente*) continuano a non

subire variazioni. Tale andamento indica anche che il fenomeno dell'aggregazione è mediato proprio dai due NH N-terminali. Essi si legano probabilmente ai C=O C-terminali, non impegnati in legami *intramolecolari*, di altre molecole peptidiche. La minor tendenza all'aggregazione del peptide **Oct-K²(Z)** è probabilmente da attribuirsi all'ingombrante catena laterale della Lys (con il gruppo protettore Z) che impedisce un avvicinamento efficace di due catene peptidiche.

Una conferma delle conclusioni appena esposte viene dall'analisi degli spettri ROESY. A titolo d'esempio, l'illustrazione 25 mostra la regione ammidica dello spettro ROESY (1 mM, 298K, 400 MHz) del peptide **Oct-K⁹(Z)** in CDCl₃. Il fatto che si possano osservare tutte le correlazioni sequenziali NH(*i*)→NH(*i*+1) è indicativo della presenza di una struttura di tipo elicoidale [63].

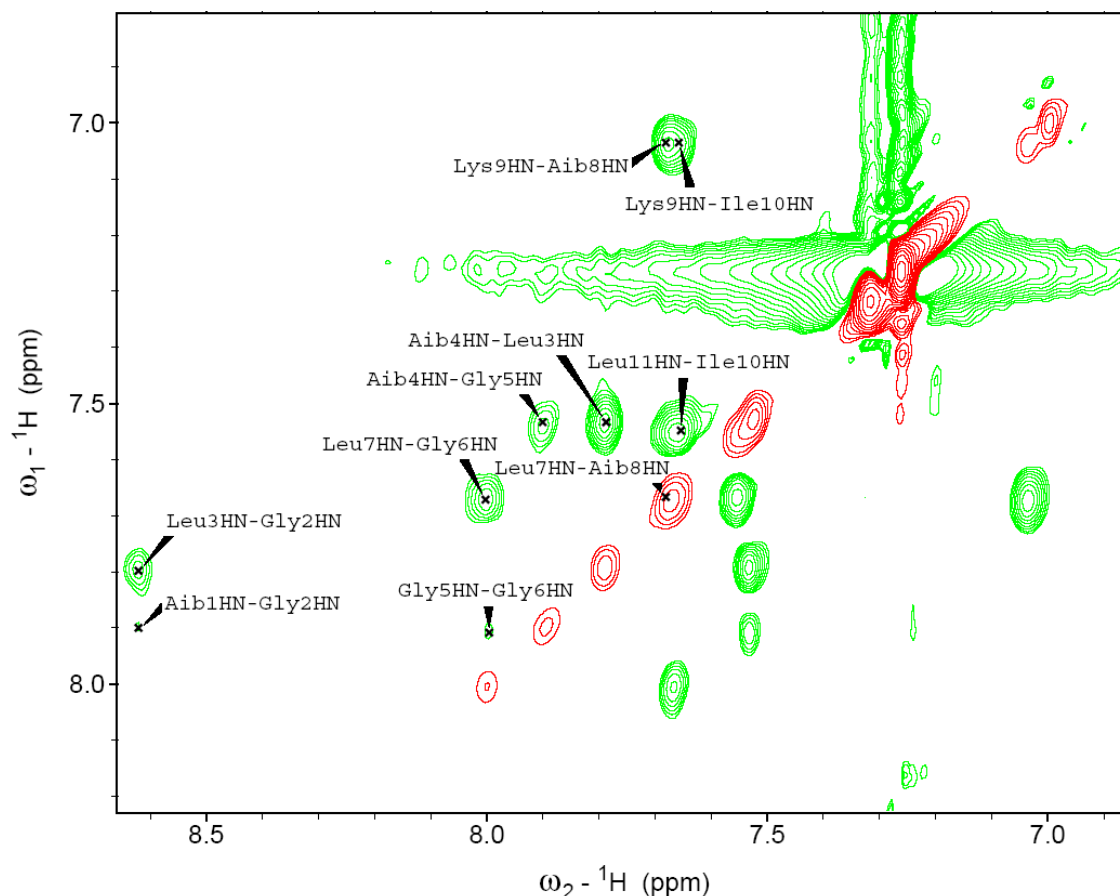


Illustrazione 25: Regione ammidica dello spettro ROESY (298 K, 400 MHz) di **Oct-K⁹(Z)** in CDCl₃ alla concentrazione di 1 mM.

In conclusione, la presente analisi NMR preliminare in CDCl₃, è in accordo con i dati degli studi di assorbimento IR. In particolare, i peptidi **Oct-K²(Z)** e **Oct-K⁹(Z)** assumono strutture elicoidali (di tipo α , 3_{10} o misto). Inoltre, **Oct-K⁹(Z)** evidenzia una maggior tendenza all'autoassociazione.

III.2.3 Dicroismo Circolare

Le preferenze conformazionali in soluzione di [Lys(HCl)², Leu(OMe)¹¹]-tricogina (**Oct-K²**), [Lys(HCl)⁹, Leu(OMe)¹¹]-tricogina (**Oct-K⁹**) e dei loro precursori sintetici [Lys(Z)², Leu(OMe)¹¹]-tricogina [**Oct-K²(Z)**] e [Lys(Z)⁹, Leu(OMe)¹¹]-tricogina [**Oct-K⁹(Z)**] sono state esaminate mediante dicroismo circolare (CD) in tre diversi solventi: MeOH, H₂O (solo per i due analoghi **Oct-K²** e **Oct-K⁹**) e SDS 100 mM in H₂O (ambiente membrano-mimetico). Non è stato possibile condurre l'analisi CD in CDCl₃, solvente utilizzato per le analisi di assorbimento IR, in quanto esso presenta un forte assorbimento nella zona spettrale UV dove assorbe il cromoforo ammidico (180-250 nm).

Le misure sono state condotte a temperatura ambiente e gli spettri sono stati acquisiti alla concentrazione 1×10^{-3} M. Si è studiata in particolare la zona tra 190 nm e 280 nm, dove si trovano le bande corrispondenti alle transizioni $n \rightarrow \pi^*$ e $\pi \rightarrow \pi^*$ del cromoforo peptidico. Le transizioni del cromoforo peptidico sono otticamente inattive, ma la presenza di centri chirali nelle vicinanze del legame peptidico (come i C^α degli amminoacidi chirali) e/o la sua appartenenza a strutture secondarie elicoidali (intrinsecamente dissimetriche) le rende otticamente attive e quindi indagabili mediante CD.

Utili informazioni si possono ottenere sia dalla forma degli spettri che dall'intensità delle bande dicroiche. Questa seconda possibilità richiede, tuttavia, di conoscere con accuratezza l'effettiva concentrazione peptidica. Con peptidi igroscopici, contenenti gruppi carichi o provenienti da processi di liofilizzazione, l'errore che si può commettere determinando la concentrazione per pesata può essere elevato. Per ottenere una stima esatta della concentrazione di un peptide in soluzione si ricorre usualmente all'assorbimento nel vicino UV. Dalla misura dell'assorbanza in questa regione spettrale di un cromoforo ad assorbività molare ϵ_M nota è possibile, infatti, risalire alla concentrazione peptidica della soluzione in esame. I peptidi sintetizzati in questo lavoro di Tesi non contengono cromofori ad ϵ_M nota, però possiedono vari legami ammidici che, come si è detto, assorbono tra 180 e 250 nm. Assumendo che ϵ_M sia la stessa per i peptidi **Oct-K²** e **Oct-K⁹** studiati, [64] il rapporto tra le misure di assorbanza del cromoforo peptidico (acquisite a $\lambda = 190$ nm) per le varie soluzioni acquose utilizzate per l'analisi CD ha permesso di ottenere corrette intensità relative negli spettri dicroici, pur non potendo fornire un valore assoluto per le concentrazioni. Per le soluzioni in

metanolo, solvente che a 200 nm presenta un forte assorbimento, la misura dell'assorbanza è stata fatta a 215 nm. Purtroppo in **Oct-K²(Z)** e **Oct-K⁹(Z)** l'assorbimento del gruppo aromatico si sovrappone a quello del cromoforo peptidico, rendendo la misura dell'assorbanza non utilizzabile. La forma delle curve e la posizione delle bande negli spettri dicroici di questi due composti possono comunque fornire informazioni preziose sul grado e sul tipo di strutturazione in soluzione.

Nell'illustrazione 26 si riportano le curve dicroiche ottenute rispettivamente per **Oct-K²** e **Oct-K⁹** nei tre solventi usati.

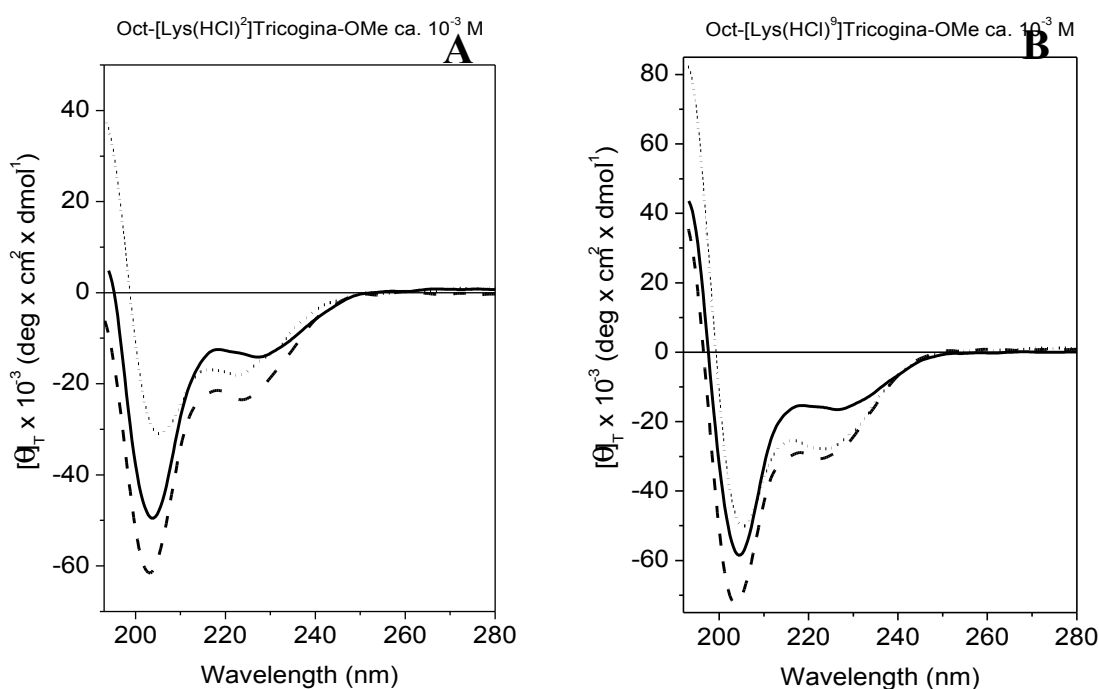


Illustrazione 26: Spettri CD di **Oct-K²** (A) e **Oct-K⁹** (B) in soluzioni di MeOH (—), H₂O (- - -) e 100 mM SDS in acqua (....). Concentrazione peptidica: 1 mM.

Nell'illustrazione 27 vengono posti a confronto gli stessi spettri CD, ma raggruppati per solvente. Infine, l'illustrazione 28 riporta gli spettri dicroici di **Oct-K²(Z)** e **Oct-K⁹(Z)** in MeOH e SDS 100 mM.

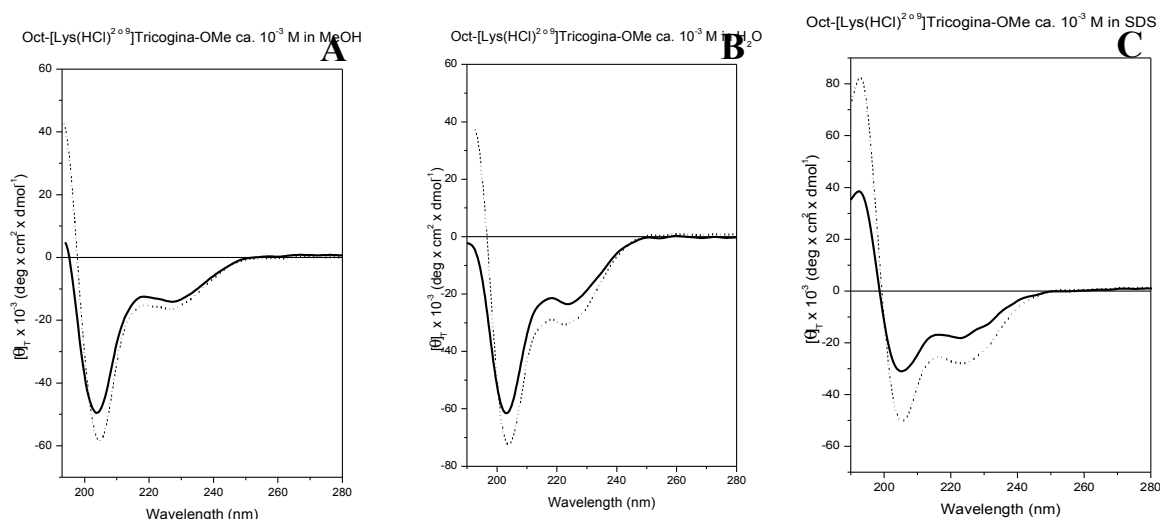


Illustrazione 27: Spettri CD di **Oct-K²** (—) e **Oct-K⁹** (....) in MeOH (A), H₂O (B) e SDS 100mM (C). Concentrazione peptidica: 1 mM.

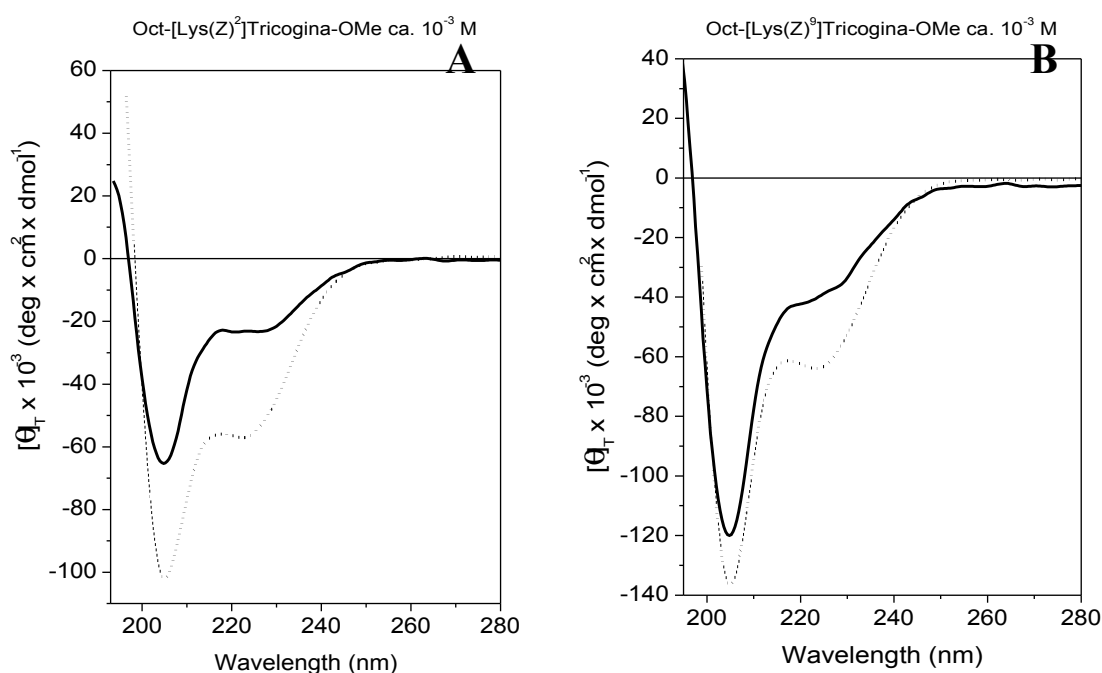


Illustrazione 28: Spettri CD di **Oct-K²(Z)** (A) e **Oct-K⁹(Z)** (B) in soluzioni di MeOH (—) e 100 mM SDS in acqua (....). Concentrazione peptidica: 1 mM

Come si può notare, al variare del solvente non vi sono drammatiche variazioni delle curve dicroiche e quindi della struttura secondaria dei peptidi esaminati. Ciò denota una spiccata stabilità conformazionale per questi undecapeptidi, molto probabilmente favorita dall'elevato numero di residui amminoacidici C^α-tetrasostituiti presenti nella sequenza. Le curve CD, al variare delle condizioni, sono sempre caratterizzate da due massimi negativi a circa 208 e 222 nm. Curve dicroiche di questo

tipo si riscontrano in strutture elicoidali destrorse sia di tipo α che 3_{10} [65,66,67]. Si ricorda che, mentre nell' α -elica destrorsa i due massimi negativi, centrati a 208 nm (transizione $\pi \rightarrow \pi^*$, componente parallela) e 222 nm (transizione $n \rightarrow \pi^*$), sono circa di pari intensità, nell'elica 3_{10} la transizione $n \rightarrow \pi^*$ presenta un'intensità decisamente ridotta rispetto alla $\pi \rightarrow \pi^*$ e tende a spostarsi leggermente a lunghezze d'onda inferiori. [68,69] Un valore del rapporto $R=[\Theta]_{222}/[\Theta]_{208}$ inferiore a 0.4 è ritenuto diagnostico della conformazione elicoidale di tipo 3_{10} , [69] mentre valori prossimi all'unità sono generalmente considerati tipici dell' α -elica, anche se non esiste al riguardo unanime consenso [70]. Valori intermedi indicano una coesistenza in soluzione delle due conformazioni elicoidali α e 3_{10} .

In Tabella 5 sono riportati i valori del rapporto $[\Theta]_{222}/[\Theta]_{208}$ (**R**) per i quattro peptidi nei vari solventi utilizzati, alla concentrazione 1 mM.

Peptide	Solvente	$\Theta_T \times 10^{-3}$ (204 nm)	$\Theta_T \times 10^{-3}$ (225 nm)	R
Oct-K²	MeOH	-49.5	-14.2	0.29
	H ₂ O	-61.6	-23.5	0.38
	SDS	-31	-18.2	0.59
Oct-K⁹	MeOH	-58.5	-16.5	0.28
	H ₂ O	-72.4	-30.7	0.42
	SDS	-50.1	-27.9	0.56
Oct-K²(Z)	MeOH	-65.3	-23.3	0.36
	SDS	-102	-57.1	0.56
Oct-K⁹(Z)	MeOH	-120	-36	0.30
	SDS	-136.6	-64	0.47

Tabella 5: Valori dell'ellitticità molare ($\deg \times \text{cm}^2 \times \text{dmol}^{-1}$) e del rapporto $[\Theta]_{222}/[\Theta]_{208}$ (**R**) per i peptidi K2H e K9H alle lunghezze d'onda corrispondenti ai due massimi negativi del loro spettro CD nei tre solventi investigati. Concentrazione peptidica: 1mM.

I valori di **R** ottenuti indicano la presenza di strutture elicoidali destrorse di tipo misto $\alpha/3_{10}$ per tutti i peptidi considerati. In particolare, in MeOH ed H₂O sembra prevalere una conformazione più vicina all'elica 3_{10} , mentre l'equilibrio conformazionale sembra spostato più verso l' α -elica in ambiente membrano-mimetico (SDS).

Riassumendo, l'analisi CD conferma e integra le informazioni tratte dagli studi conformazionali condotti mediante NMR e assorbimento IR in CDCl₃.

III.3 Interazioni con membrane fosfolipidiche

III.3.1 Modulazione della permeabilità di membrane lipidiche artificiali

I quattro analoghi della tricogina sintetizzati in questa Tesi sono stati saggiati in un test preliminare, atto a verificare se posseggano la capacità di alterare la permeabilità dei doppi strati fosfolipidici. Come termine di confronto cui rapportare le attività misurate è stata usata la tricogina GA IV. [47]

Per concentrazioni diverse di peptide è stata determinata, mediante misure di fluorescenza, la capacità di far rilasciare da SUV di PC/Ch (7:3) la CF precedentemente inglobata. Il rilascio di CF è stato misurato dopo 20 minuti dall'aggiunta del peptide alla soluzione dei liposomi. Una rappresentazione schematica dell'esperimento è riportata in illustrazione 29.

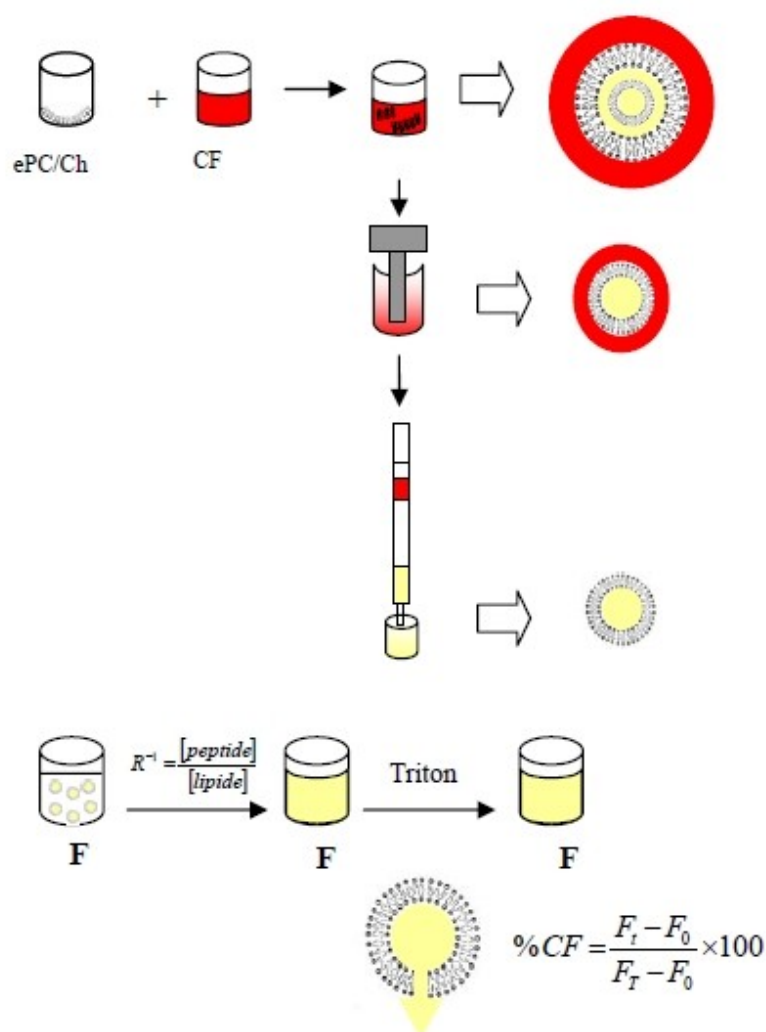


Illustrazione 29: Schema dell'esperimento 'leakage'

Procedendo alla misura della fluorescenza relativa ai campioni in analisi, due sono le eventualità che si possono verificare. Nel caso in cui la CF rimanga completamente inglobata nelle membrane fosfolipidiche integre, l'emissione di fluorescenza è modesta: si verifica infatti il fenomeno dell'*auto-quenching*, dovuto all'elevata concentrazione di CF all'interno delle vescicole. Se, invece, il peptide introdotto rende più permeabile la membrana fosfolipidica, la CF fuoriesce dalle vescicole, diluendosi nell'ambiente circostante: si registra come conseguenza un notevole aumento di fluorescenza. Il valore di massima fluorescenza può essere ricavato aggiungendo Triton alla soluzione lipidica; il tensioattivo iniettato, infatti, opera la completa disgregazione delle membrane causando il rilascio totale di CF.

Il saggio è stato eseguito sui seguenti composti, in soluzione di MeOH:

Oct-K²: [Lys(HCl)², Leu(OMe)¹¹]-tricogina

Oct-K²(Z): [Lys(Z)², Leu(OMe)¹¹]-tricogina

Oct-K⁹: [Lys(HCl)⁹, Leu(OMe)¹¹]-tricogina

Oct-K⁹(Z): [Lys(Z)⁹, Leu(OMe)¹¹]-tricogina

Oct-EB-OH: Ott-Aib-Gly-Leu-Aib-Gly-Gly-Leu-Aib-OH

Oct-EB: Ott-Aib-Gly-Leu-Aib-Gly-Gly-Leu-Aib-OBu

Tricogina GA IV

Nell'illustrazione 30 sono riportati i risultati della misure di rilascio di CF da liposomi ottenuti con le modalità sopra descritte.

Le curve ottenute hanno un chiaro andamento a sigmoide, indicativo di un meccanismo di azione di tipo cooperativo. In altre parole è necessario che i peptidi raggiungano una concentrazione minima, tale da permettere la formazione di aggregati, prima che riescano a iniziare il processo di permeazione dei doppi strati fosfolipidici. Dal confronto tra le due figure si può notare come la variazione del solvente non provochi modifiche all'andamento delle curve.

Tutti gli analoghi della tricogina sintetizzati durante questo lavoro di Tesi mostrano un'attività almeno equivalente a quella del peptaibolico naturale. E' interessante notare come l'attività aumenti con l'aumentare dell'idrofobicità totale del peptide: gli analoghi contenenti il residuo di Lys Z-protetto sono più attivi dei

corrispondenti deprotetti. Inoltre, il segmento ottapeptidico N-terminale della tricogina mostra una certa attività solo se la sua estremità C-terminale è protetta. Questo può essere dovuto ad una maggiore affinità degli analoghi protetti per la parte interna (idrofobica) del doppio strato fosfolipidico e suggerire pertanto possibili meccanismi di interazione. Studi precedenti hanno già evidenziato che la sostituzione dell'amminoalcol Lol con un residuo di Leu protetto come estere metilico non altera in modo significativo l'attività del peptaibolico naturale. [47]

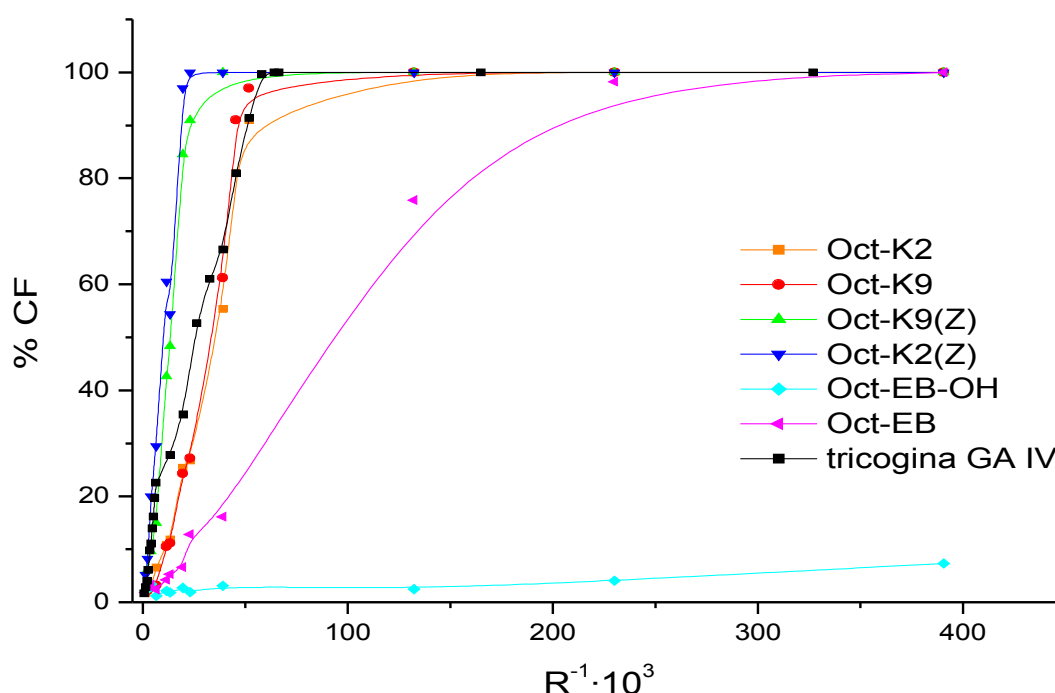
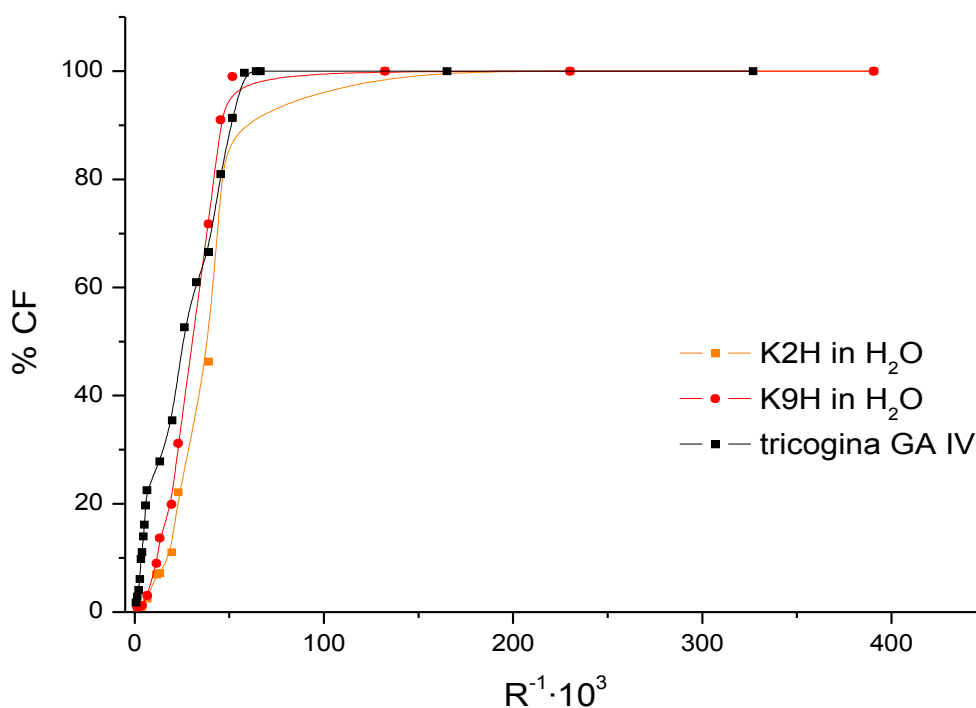


Illustrazione 30: Rilascio di CF da vescicole di PC/Ch (7:3) dopo 20 minuti, a diversi rapporti $R_i^{-1} = [\text{peptide}]/[\text{lipide}]$, indotto dagli analoghi della tricogina sintetizzati e dal segmento 1-8 della tricogina libero e protetto come estere tert-Butilico, sciolti in MeOH.

Si ricorda comunque che una maggiore attività verso le vescicole utilizzate in questo studio non costituisce necessariamente una qualità favorevole per questi peptaibolici. Infatti, le membrane delle cellule batteriche sono alquanto diverse dal modello qui utilizzato, che risulta comunque valido come "screening" preliminare. Per una valutazione più approfondita dell'attività antibiotica di questi analoghi rispetto alla tricogina naturale, sarà pertanto necessario attendere l'esito degli studi antibatterici, attualmente in corso presso i laboratori del prof. Kyung-Soo Hahm (Chosun University, Gwangju, Corea).

Poiché i due analoghi **Oct-K²** e **Oct-K⁹** sono solubili in H₂O, si è pensato di valutare l'effetto del solvente sulla loro attività, testando questi peptidi disciolti in H₂O ed in MeOH (Illustrazione 25). Non si è notata alcuna differenza apprezzabile. Pertanto, tutta l'attività di permeabilizzazione delle membrane è esclusivamente dovuta al peptide e non al solvente organico usato per portarlo nella soluzione acquosa.



*Illustrazione 31: Rilascio di CF da vescicole di PC/Ch (7:3) dopo 20 minuti, a diversi rapporti $R_i^{-1} = [\text{peptide}]/[\text{lipide}]$, indotto dagli analoghi **Oct-K²** e **Oct-K⁹** della tricogina, sciolti in H₂O. Come riferimento si mostra la tricogina GA IV sciolta in MeOH.*

IV Conclusioni:

Il lavoro di sintesi peptidica e caratterizzazione conformazionale riportato in questa Tesi ha permesso di preparare per via chimica due analoghi della tricogina GA IV, caratterizzati dall'inserimento di un residuo di Lys al posto di uno di Gly. Si è potuto verificare che combinando opportunamente la strategia di sintesi peptidica *step-by-step* con la condensazione di segmenti, si riescono ad ottenere buone quantità di peptide, ad elevato grado di purezza, in tempi ragionevoli.

L'indagine conformazionale in soluzione, condotta mediante assorbimento IR, spettrometria NMR e dicrosso circolare, ha indicato che i peptidi esaminati assumono conformazioni elicoidali, probabilmente di tipo misto $\alpha/3_{10}$. Tale osservazione consente di concludere che la sostituzione di una Gly con una Lys non altera la conformazione della tricogina. Pertanto, si presume che anche l'attività antibatterica e il meccanismo d'azione sulle membrane biologiche non risulti alterato.

Questa previsione è supportata dagli studi di interazione con membrane modello (formate da fosfatidilcolina e colesterolo) riportati in questa Tesi: la tricogina e i due analoghi con la Lys hanno la stessa attività.

Sono attualmente in corso test su una serie di colture batteriche (presso i laboratori del prof. Kyung-Soo Hahm, Chousun University, Gwangju, Corea) per verificare se l'attività antimicrobica degli analoghi della tricogina con Lys sia migliore (aumentata o più selettiva) rispetto a quella del peptide naturale.

V Bibliografia

- 1 Roeske, R.W. e Kennedy, S.J., in "*Chemistry and Biochemistry of Amino Acids, Peptides and Proteins*", Vol. 7, Weinstein, B. Ed., Dekker, New York, pp. 205-265 (1983).
- 2 Benedetti, E., Bavoso, A., Di Blasio B., Pavone, V., Pedone, C., Toniolo, C. e Bonora, G.M., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**, 7951 (1982).
- 3 Brückner, H. e Graf, H., *Experientia*, **39**, 528 (1983).
- 4 (a) Auvin-Guette, C., Rebuffat, S., Prigent, Y. e Bodo, B., in "*Peptides 1990*", Giralt, E. e Andreu, D. Eds., ESCOM, Leiden, pp.428-429 (1991); (b) Auvin-Guette, C., Rebuffat, S., Prigent, Y. e Bodo, B., *J. Am. Chem. Soc.*, **114**, 2170 (1992).
- 5 Toniolo, C., Crisma, M., Formaggio, F., Pirrone, L., Bonora, G. M., Mammi, S. e Peggion, E., in "*Peptides 1992*", Schneider, C. H. e Eberle, A. N. Eds., ESCOM, Leiden, pp.613-614 (1993).
- 6 Auvin-Guette, C., Rebuffat, S., Vuidepot, I., Messias, M. e Bodo, B., *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, 249 (1993).
- 7 Fujita, T., Wada, S., Iida, A., Nishimura, T., Kanai, M. e Toyama, N., *Chem. Pharm. Bull.*, **42**, 489 (1994).
- 8 Toniolo, C., Crisma, M., Formaggio, F., Peggion, C., Epand, R. F. e Epand, R. M., *Cell. Mol. Life Sci.*, **58**, 1179 (2001).
- 9 Kleinkauf, H. e von Döhren, H., *Eur. J. Biochem.*, **192**, 1 (1990).
- 10 Davoust, D., Bodo, B., Rebuffat, S. e Platzer, N., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **116**, 1 (1983).
- 11 Rebuffat, S., El Hajji, M., Hennig, P., Davoust, D. e Bodo, B., *Int. J. Pept. Protein Res.*, **34**, 200 (1989).
- 12 Marshall, G.R., in *Intra-Science Chemistry Reports*, Vol. 5, Kharasch, N. Ed., Gordon and Breach, New York, pp. 305-316 (1971).
- 13 Venkataram Prasad, B.V. e Sasisekharan, V., *Macromolecules*, **12**, 1107 (1979).
- 14 (a) Paterson, Y., Rumsey, S.M., Benedetti, E., Némethy, G. e Scheraga, H.A., *J. Am. Chem. Soc.*, **103**, 2947 (1981); (b) Improta, R., Rega, N., Aleman, C. e Barone, V., *Macromolecules*, **34**, 7550 (2001).
- 15 Toniolo, C. e Benedetti, E., *Trends Biochem. Sci.*, **16**, 350 (1991).
- 16 IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature, *Biochemistry*, **9**, 3471

- (1970).
- 17 Venkatachalam, C.M., *Biopolymers*, **6**, 1425 (1968).
 - 18 Rose, G.D., Gierasch, L.M. e Smith, J.A., *Adv. Protein Chem.*, **37**, 1 (1985).
 - 19 Toniolo, C., *CRC Crit. Rev. Biochem.*, **9**, 1 (1980).
 - 20 Benedetti, E., Bavoso, A., Di Blasio, B., Pavone, V., Pedone, C., Crisma, M., Bonora, G.M. e Toniolo, C., *J. Am. Chem. Soc.*, **104**, 2437 (1982).
 - 21 Toniolo, C., Valle, G., Bonora, G.M., Crisma, M., Formaggio, F., Bavoso, A., Benedetti, E., Di Blasio, B., Pavone, V. e Pedone, C., *Biopolymers*, **25**, 2237 (1986).
 - 22 Valle, G., Crisma, M., Toniolo, C., Beißwenger, R., Rieker, A. e Jung, G., *Liebigs Ann. Chem.*, 337 (1989).
 - 23 Valle, G., Crisma, M. e Toniolo, C., *Zeit. Kristallogr.*, **188**, 261 (1989).
 - 24 Souhassou, M., Smith, G.D., Leplawy, M.T. e Marshall, G.R., *Acta Crystallogr.*, **A46**, suppl., C-140, PS-04.01.16 (1990).
 - 25 Pavone, V., Di Blasio, B., Pedone, C., Santini, A., Benedetti, E., Formaggio, F., Crisma, M. e Toniolo, C., *Gazz. Chim. Ital.*, **121**, 21 (1991).
 - 26 Di Blasio, B., Santini, A., Pavone, V., Pedone, C., Benedetti, E., Moretto, V., Crisma, M. e Toniolo, C., *Struct. Chem.*, **2**, 523 (1991).
 - 27 Bavoso, A., Benedetti, E., Di Blasio, B., Pavone, V., Pedone, C., Toniolo, C. e Bonora G.M., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **83**, 1988 (1986).
 - 28 Pavone, V., Di Blasio, B., Santini, A., Benedetti, E., Pedone, C., Toniolo, C. e Crisma, M., *J. Mol. Biol.*, **214**, 633 (1990).
 - 29 Toniolo, C., Crisma, M., Bonora, G.M., Benedetti, E., Di Blasio, B., Pavone, V., Pedone, C. e Santini, A., *Biopolymers*, **31**, 129 (1991).
 - 30 Geßmann, R., Brückner, H. e Kokkinidis, M., *Acta Crystallogr.*, **B54**, 300 (1998).
 - 31 Geßmann, R., Brückner, H. e Petratos, K., *J. Pept. Sci.*, **9**, 753 (2003).
 - 32 (a) Paterson, Y., Stimson, E.R., Evans, D.J., Leach, S.J. e Scheraga, H.A., *Int. J. Pept. Protein Res.*, **20**, 468 (1982); (b) Toniolo, C., Bonora, G.M., Barone, V., Bavoso, A., Benedetti, E., Di Blasio, B., Grimaldi, P., Lelj, F., Pavone, V. e Pedone, C., *Macromolecules*, **18**, 895 (1985).
 - 33 Karle, I.L. e Balaram, P., *Biochemistry*, **29**, 6747 (1990).
 - 34 (a) Benedetti, E., Di Blasio, B., Pavone, V., Pedone, C., Santini, A., Crisma, M. e Toniolo, C., in *"Molecular Conformation and Biological Interactions"*, Balaram, P. e Ramaseshan, S. Eds., Indian Academy of Science, Bangalore, pp. 497-502

- (1991); (b) Toniolo, C., Crisma, M., Formaggio, F. e Peggion, C., *Biopolymers (Pept. Sci.)*, **60**, 396 (2001).
- 35 Toniolo, C., Peggion, C., Crisma, M., Formaggio, F., Shui, X. e Eggleston, D.S., *Nature: Struct. Biol.*, **1**, 908 (1994).
- 36 Shai, Y. e Oren, Z., *Biopolymers (Pept. Sci.)*, **47**, 451 (1998).
- 37 Monaco, V., Formaggio, F., Crisma, M., Toniolo, C., Hanson, P. e Millhauser, G.L., *Biopolymers*, **50**, 239 (1999).
- 38 Toniolo, C., Valente, E., Formaggio, F., Crisma, M., Pilloni, G., Corvaja, C., Toffoletti, A., Martinez, G.V., Hanson, M.P., Millhauser, G.L., George, C. e Flippen-Anderson, J.L., *J. Pept. Sci.*, **1**, 45 (1995).
- 39 Smythe, M.L., Nakaie, C.R. e Marshall, G.R., *J. Am. Chem. Soc.*, **118**, 10555 (1996).
- 40 Hanson, P., Millhauser, G., Formaggio, F., Crisma, M. e Toniolo, C., *J. Am. Chem. Soc.*, **118**, 7618 (1996).
- 41 Flippen-Anderson, J.L., George, C., Valle, G., Valente, E., Bianco, A., Formaggio, F., Crisma, M. e Toniolo, C., *Int. J. Pept. Protein Res.*, **47**, 231 (1996).
- 42 Hanson, P., Martinez, G., Millhauser, G., Formaggio, F., Crisma, M., Toniolo, C. e Vita, C., *J. Am. Chem. Soc.*, **118**, 271 (1996).
- 43 Crisma, M., Bianco, A., Formaggio, F., Toniolo, C. e Kamphuis, J., *Lett. Pept. Sci.*, **2**, 187 (1995).
- 44 Hanson, P., Martinez, G., Millhauser, G., Formaggio, F., Crisma, M., Toniolo, C. e Vita, C., *Mol. Phys.*, **95**, 957 (1998).
- 45 Epand, R.F., Epand, R.M., Monaco, V., Stoia, S., Formaggio, F., Crisma, M. e Toniolo, C., *Eur. J. Biochem.*, **266**, 1021 (1999).
- 46 (a) Mazzuca, C., Stella, L., Venanzi, M., Formaggio, F., Toniolo, C. e Pispisa, B., *Biophys. J.*, **88**, 3411 (2005); (b) Stella, L., Mazzuca, C., Venanzi, M., Palleschi, A., Didonè, M., Formaggio, F., Toniolo, C. e Pispisa, B., *Biophys. J.*, **86**, 936 (2004).
- 47 Toniolo, C., Crisma, M., Formaggio, F., Peggion, C., Monaco, V., Goulard, C., Rebuffat, S. e Bodo, B., *J. Am. Chem. Soc.*, **118**, 4952 (1996).
- 48 Locardi, E., *Tesi di Laurea*, Dipartimento di Chimica Organica, Università di Padova, Anno Accademico 1994/1995.
- 49 Eggleston, D.S., Shui, X., Monaco, V., Formaggio, F., Crisma, M. e Toniolo, C. in *"Peptides: Chemistry, Structure and Biology"*, P.T.P. Kaumaya e R.S. Hodges ed.,

- Mayflower Scientific Ltd., Kingswinford, England, pp. 436-437 (1996).
- 50 Epand, R.F., Epand, R.M., Formaggio, F., Crisma, M., Wu, H., Lehrer, R. e Toniolo, C., *Eur. J. Biochem.*, **268**, 703 (2001).
- 51 Vallon-Eberhard, A., Makovitzki, A., Beauvais, A., Latgé, J.-P., Jung, S. e Shai Y., *Antimicrob. Agents Chemother.*, **52**, 3118 (2008).
- 52 a) Still, W.C., Khan, M. e Mitra, A., *J. Org. Chem.*, **43**, 2923 (1978). C) Connel, E., Dixon, G.H. e Hones, C.S., *Can. J. Biochem. Physiol.*, **33**, 416 (1985). c) Bergmann, M., Zervas, L., Fruton, J.S., Schneider, F. e Schleich, H., *J. Biol. Chem.*, **109**, 325 (1935).
- 53 Oki, K., Suzuki, K., Tuchida, S., Saito, T. e Kotake, H., *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **43**, 2554 (1970)
- 54 Warner, V.D., Warner, A.M., Vasselli, J.R., Decke, E., Pi-Sunyer, F.X. e Woods, S.C., *J. Pharm. Sci.*, **62**, 1186 (1973).
- 55 a) Valle, G., Formaggio, F., Crisma, M., Bonora, G.M., Toniolo, C., Bavoso, A., Benedetti, E., Di Blasio, B., Pavone, V. e Pedone, C., *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2*, 1371 (1986); b) McGahren W.J. e Goodman M., *Tetrahedron*, **23**, 2017 (1967).
- 56 (a) Bergmann, M., Zervas, L., Fruton, J.S., Schneider, F. e Schleich, H., *J. Biol. Chem.*, **109**, 325 (1935). (b) Winitz, M., Block-Frankenthal, L., Izumiya, N., Birnbaum, S.M., Baker, C.G. e Greenstein, J.P., *J. Am. Chem. Soc.*, **78**, 2423 (1956). (c) Sakakibara, S. e Fujino, M., *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **39**, 947 (1966).
- 57 (a) Okumura, Y. e Sakurai, A., *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **46**, 2190 (1973). (b) Toniolo, C., Crisma, M., Formaggio, F., Peggion, C., Monaco, V., Goulard, C., Rebuffat, S. e Bodo, B., *J. Am. Chem. Soc.*, **118**, 4952 (1996).
- 58 Carpino, L.A., *J. Am. Chem. Soc.*, **115**, 4397 (1993).
- 59 (a) Toniolo, C., Crisma, M. e Formaggio, F., *Biopolymers (Pept. Sci.)*, **40**, 627 (1996); (b) Crisma, M., Valle, G., Moretto, V., Formaggio, F., Toniolo, C. e Albericio, F., *Lett. Pept. Sci.*, **5**, 247 (1998).
- 60 Bellamy, M., in *The Infra-Red Spectra of Complex Molecules*, Methuen, London (1956)
- 61 Rif.: a) Palumbo, M., Da Rin, S., Bonora, G.M. e Toniolo, C., *Makromol. Chem.*, **177**, 1477 (1976). b) Bonora, G. M., Mapelli, C., Toniolo, C., Wilkening, R. R. e Stevens, E. S., *Int. J. Biol. Macromol.*, **6**, 179 (1984). c) Mizushima, S., Shimanouchi, T., Tsuboi, M. e Souda, R., *J. Am. Chem. Soc.*, **74**, 270 (1952).
- 62 (a) R. Martin e G. Hauthal, in *"Dimethyl Sulphoxide"*, Van Nostrand-Reinhold,

- Wokingham, U.K., (1975); (b) T.P. Pitner e D.W. Urry, *J. Am. Chem. Soc.*, **94**, 1399 (1972).
- 63 K. Wüthrich, *NMR of Protein and Nucleic Acids*, Wiley, New York (1986).
- 64 B.J.H. Kuipers e H. Gruppen, *J. Agric. Food Chem.*, **55**, 5445-5451 (2007).
- 65 S. Beychok, in *"Poly- α -Amino Acids"*, Vol. 1, G.D. Fasman Ed., Dekker, New York, pp. 293-337 (1967).
- 66 A.W. Woody e I. Tinoco Jr., *J. Chem. Phys.*, **46**, 4927 (1967).
- 67 T.S. Sudha, E.K.S. Vijayakumar e P. Balaram, *Int. J. Pept. Protein Res.*, **22**, 464 (1983).
- 68 M.C. Manning e R.W. Woody, *Biopolymers*, **31**, 569 (1991).
- 69 C. Toniolo, A. Polese, F. Formaggio, M. Crisma e J. Kamphuis, *J. Am. Chem. Soc.*, **118**, 2744 (1996).
- 70 P. Wallimann, R.J. Kennedy e D.S. Kemp, *Angew. Chem. Int. Engl.*, **38**, 1290 (1999).